

UNIVERZITET U BEOGRADU

HEMIJSKI FAKULTET

Petar M. Ristivojević

**ODREĐIVANJE HEMIJSKOG SASTAVA,
ANTIOKSIDATIVNIH I ANTIMIKROBNIH
SVOJSTAVA PROPOLISA TOPOLA TIPA IZ
RAZLIČITIH REGIONA SRBIJE**

Doktorska disertacija

Beograd, 2014

UNIVERSITY OF BELGRADE

FACULTY OF CHEMISTRY

Petar M. Ristivojević

**DETERMINATION OF CHEMICAL,
COMPOSITION ANTIOXIDATIVE AND
ANTIMICROBIAL PROPERTIES OF POPLAR TYPE
PROPOLIS COLLECTED FROM DIFFERENT
REGIONS OF SERBIA**

Doctoral Dissertation

Belgrade, 2014

Mentor:

dr Dušanka Milojković-Opsenica
redovni profesor Hemijskog fakulteta,
Univerziteta u Beogradu

Članovi komisije:

dr Živoslav Tešić
redovni profesor Hemijskog fakulteta
Univerziteta u Beogradu

dr Slaviša Stanković
vanredni profesor Biološkog fakulteta,
Univerziteta u Beogradu

dr Nebojša Nedić
docent Poljoprivrednog fakulteta,
Univerziteta u Beogradu

Datum odbrane:

Zahvalnica

Ova doktorska disertacija je urađena na Katedri za analitičku hemiju Hemijskog fakulteta, Univerziteta u Beogradu pod mentorstvom dr Dušanke Milojković-Opsenice, redovnog profesora Hemijskog fakulteta u Beogradu.

Autor koristi priliku da se zahvali prof. dr Dušanki Milojković-Opsenici na svestranoj pomoći i podršci u svim fazama izrade doktorske teze, kao i na korisnim sugestijama.

Zahvaljujem se prof. dr Živoslavu Tešiću na ukazanom poverenju i uspešnoj saradnji, takođe koristim priliku da se zahvalim prof. dr Slaviši Stankoviću i doc. dr Nebojši Nediću na stručnoj pomoći i korisnim sugestijama tokom izrade i pisanja doktorske teze.

Veliku zahvalnost dugujem prof. dr Ljubiši Stanisavljeviću, dr Jeleni Trifković, dr Filipu Andriću, dr Daliboru Stankoviću, dr Jeleni Nešić i Ivici Dimkiću na svestranoj pomoći i tokom pisanja rada i tokom eksperimentalnog rada.

Zahvaljujem se prof. dr Gertrud Elisabeth Morlock, sa Justus Liebig University Gießen na stručnoj pomoći tokom izrade teze.

Autor koristi priliku da se zahvali Stefani Krstić, Voji Baljku, Nini Božinović i Igoru Matijaševiću, Urošu Gašiću kao i kolegama iz laboratorija 551 i 552 na višegodišnjoj moralnoj podršci tokom izrade teze.

Ovaj rad posvećujem roditeljima Milomiru i Svetlani Ristivojević, bratu Marku i mojoj Maji.

Određivanje hemijskog sastava, antioksidativnih i antimikrobnih svojstava propolisa topola tipa iz različitih regiona Srbije

Cilj ove doktorske disertacije je hemijska i funkcionalna karakterizacija propolisa topola tipa koji potiče iz različitih regiona Srbije primenom analitičkih i tehnika za određivanje antimikrobne aktivnosti u kombinaciji sa multivarijantnim hemometrijskim metodama.

Fenolni profili srpskog propolisa je određen visokoeфикаsnom tankoslojnom hromatografijom (**H**igh **P**erformance **T**hin-**L**ayer **C**hromatography, HPTLC) da bi se uočile sličnosti, odnosno razlike između uzoraka različitog botaničkog i geografskog porekla. Ispitivani su fenolni profili propolisa iz regiona (Hrvatska, Slovenija) i nemačkog kao tipičnog zapadnoevropskog propolisa topola tipa u cilju poređenja sa srpskim. Na osnovu dobijenih rezultata srpski propolis je klasifikovan prema botaničkom poreklu na dva tipa. Analiza glavnih komponenata je primenjena u cilju određivanja fenola karakterističnih za srpski propolis i potvrde prisustva dva tipa propolisa.

Primenom visokoeфикаsne tečne hromatografije u kombinaciji sa linearnim trapom i Orbitrapom MS/MS (**U**ltra **P**erformance **L**iquid **C**hromatography (UPLC)-Lineartrap Orbitrap MS/MS) visoke rezolucije određen je sadržaj flavonoida karakterističnih za propolis topola tipa. Takođe, različite klase fenolnih jedinjenja su identifikovane u srpskom propolisu i određeni fenolni markeri za oba tipa propolisa. Analiza glavnih komponenata je primenjena na rezultate dobijene visokoeфикаsnom tečnom hromatografijom u kombinaciji sa linearnim trapom i Orbitrapom MS/MS da bi se klasifikovali uzorci srpskog propolisa i odredili fenolni markeri za oba tipa propolisa. Pored toga, analiza glavnih komponenata je primenjena na masene signale (dobijene direktnom analizom u realnom vremenu, DART) u cilju poređenja nemačkog propolisa sa srpskim. Fenolni profil ekstrakata smola pupoljaka topole kao potencijalnog botaničkog izvora je određen u cilju poređenja sa ekstraktima propolisa.

Na osnovu ispitivanja apsorpcionih UV/VIS spektara i cikličnih voltamograma srpskog propolisa uočeno je prisustvo dva tipa propolisa. Parametri izvedeni iz ciklične

voltometrije ukazuju na razlike u fenolnom profilu i antioksidativnim svojstvima između dva botanički različita tipa srpskog propolisa. Multivarijantne metode primenjene na UV/VIS spektre i ciklične voltamograme potvrđuju rezultate dobijene na osnovu hromatografskih ispitivanja.

Etanolni ekstrakti srpskog propolisa klasifikovani na osnovu HPTLC su dalje ispitivani u cilju određivanja ukupnog sadržaja fenola, ukupnih flavonoida i relativnog antioksidativnog kapaciteta. Korelacijom ukupnog sadržaja fenola i antioksidativne aktivnosti moguće je utvrditi doprinos pojedinačnih fenolnih jedinjenja antioksidativnoj aktivnosti.

Sadržaj esencijalnih i toksičnih elemenata je određen primenom indukovano kuplovane plazme sa optičkom emisionom spektroskopijom. Na osnovu sadržaja toksičnih metala i metaloida, kao indikatora zagađenja životne sredine, uočena je mala zagađenost. Sa druge strane, utvrđena je raznolikost u geografskom poreklu među uzorcima srpskog propolisa.

Tehnike za određivanje antimikrobne aktivnosti pojedinačno i u kombinaciji sa multivarijantnim metodama ukazuju na razlike u aktivnosti srpskog propolisa prema Gram-pozitivnim i Gram-negativnim bakterijama. Bioautografija je primenjena u cilju identifikacije koje komponente iz propolisa su najodgovornije za antimikrobnu aktivnost srpskog propolisa. Regresione multivarijantne metode su primenjene u cilju identifikacije komponentata koje ispoljavaju dominantnu antimikrobnu aktivnost.

Ključne reči: srpski propolis, fenolni profil, HPTLC, UPLC-Orbitrap-MS/MS, ciklična voltimetrija, UV/VIS spektrofotometrija, multivarijantna analiza, antioksidativni kapacitet, antimikrobna aktivnost

Naučna oblast: Hemija

Uža naučna oblast: Analitička hemija

UDK broj: 543

Determination of chemical composition, antioxidative and antimicrobial properties of poplar type propolis collected from different regions of Serbia

The main goal of this PhD thesis was chemical and functional characterization of poplar type of propolis using different analytical and techniques for determination of antimicrobial activity in combination with multivariate chemometric methods.

Phenolic profile of Serbian propolis was determined using HPTLC (**H**igh **P**erformance **T**hin-**L**ayer **C**hromatography) technique in order to determine similarities and differences between samples according to their geographical and botanical origin. From the obtained results, samples of Serbian propolis can be separated in two types according to their botanical origin. Further, phenolic profile of Slovenian, Croatian and German propolis, as typical representative of Western European type of propolis, were investigated in order to get comparison with Serbian propolis. Principal component analysis was applied in order to determine characteristic phenol marker compounds in Serbian propolis.

Powerful ultra high-performance liquid chromatography coupled with mass spectrometry (UPLC-Orbitrap MS/MS technique) was applied for determination of phenolic profile of Serbian propolis, and quantification of characteristic phenol marker compounds in Serbian propolis. Also, different classes of phenolic compounds were identified in Serbian propolis and determined characteristic phytochemical markers of both types of propolis. Principal component analysis was applied on quantified phenols in order to verify two types of propolis, and determine phenol marker compounds. Principal component analysis was applied on samples of German propolis and mass signals obtained from direct analysis in real time technique, were used as variables.

UV/VIS spectra and cyclic voltammetry also confirmed existence of two types of Serbian propolis. Results obtained from cyclic voltammetry show differences between phenol content and antioxidative capacity among these botanically different types of propolis. Multivariate analysis was applied on UV/VIS spectra of propolis, and those results confirmed presence of two types of propolis. Phenolic profile of poplar buds, as one

of potential botanical source of propolis, were determined in order to compared them with propolis extracts.

Etanolic extracts of Serbian propolis classified by HPTLC study, were investigated in order to determine total phenol content, content of flavonoids and antioxidative capacity of extracts. By correlating the contents of total phenolics and antioxidant activity it is possible to determine the contribution of phenolic compounds on antioxidant activity.

Content of essential and toxic metals and metaloids was determined by Inductively Coupled Plasma Optical Emission Spectrometry. Results obtained in this way can be indicator of environmental pollution. Also, from the determination of metal content can be concluded which metals are characteristic for propolis of different geographical origin.

Disc diffusion method and minimal inhibition concentration assay show different antimicrobial activity of Serbian propolis against Gram-positive and Gram-negative bacteria. Multivariate analysis shows differences between antimicrobial activity among two types of propolis. Bioautography was applied in order to identify phenolic compounds in propolis which posses antimicrobial activity. Multivariate regression methods were used to identify the components that predominantly exhibit antimicrobial activity.

Keywords: Serbian propolis, phenolic profile, HPTLC, UPLC-Orbitrap-MS/MS, cyclic voltammetry, UV/VIS spectrophotometry, multivariate analysis, antioxidative and antimicrobial activities

Scientific field: Chemistry

Field of Academic Expertise: Analytical Chemistry

UDC Number: 543

SADRŽAJ

1. UVOD	1
2. OPŠTI DEO.....	4
2.1. <i>Propolis kroz istoriju</i>	<i>4</i>
2.2. <i>Prikupljanje propolisa</i>	<i>5</i>
2.3. <i>Botaničko i geografsko poreklo propolisa</i>	<i>6</i>
2.4. <i>Hemijski sastav propolisa.....</i>	<i>9</i>
2.4.1. <i>Vosak</i>	<i>10</i>
2.4.2. <i>Fenolna jedinjenja karakteristična za propolis</i>	<i>10</i>
2.5. <i>Biološka svojstva propolisa</i>	<i>14</i>
2.5.1. <i>Antimikrobna aktivnost propolisa.....</i>	<i>14</i>
2.5.2. <i>Antioksidativna aktivnost propolisa</i>	<i>14</i>
2.6. <i>Kontrola kvaliteta i standardizacija propolisa</i>	<i>16</i>
2.7. <i>Analitičke metode za ispitivanje hemijskog sastava propolisa</i>	<i>17</i>
2.7.1. <i>Tankoslojna hromatografija</i>	<i>17</i>
2.7.2. <i>Masena spektrometrija</i>	<i>20</i>
2.7.3. <i>UV/VIS spektrofotometrijsko ispitivanje propolisa</i>	<i>26</i>
2.7.4. <i>Ciklična voltametrija fenolnih jedinjenja.....</i>	<i>29</i>
2.7.5. <i>Određivanje sadržaja metala</i>	<i>30</i>
2.8. <i>Ispitivanje antimikrobne aktivnosti propolisa.....</i>	<i>31</i>
2.8.1. <i>Disk difuzioni metod</i>	<i>31</i>
2.8.2. <i>Određivanje minimalne inhibitorne koncentracije (MIC, minimal inhibition concentration)</i>	<i>32</i>
2.8.3. <i>Bioautografija.....</i>	<i>32</i>
2.9. <i>Hemometrijske metode.....</i>	<i>34</i>
2.9.1. <i>Analiza glavnih komponenata (PCA).....</i>	<i>34</i>
2.9.2. <i>Klasterska analiza i toplotna mapa.....</i>	<i>35</i>
2.9.3. <i>Metoda delimičnih najmanjih kvadrata (PLS) i metoda delimičnih najmanjih kvadrata sa diskriminantnim pristupom (PLS-DA).....</i>	<i>36</i>
2.9.4. <i>Linearna diskriminanta analiza, LDA.....</i>	<i>37</i>
2.9.5. <i>Priprema slike hromatograma za multivarijantnu analizu.....</i>	<i>37</i>

3. EKSPERIMENTALNI DEO 39

3.1. Reagensi.....	39
3.2. Ekstrakcija.....	40
3.2.1. Ekstrakcija propolisa.....	40
3.3. Visokoeфикасна tankoslojna hromatografija srpskog i nemačkog propolisa.....	41
3.3. 1. Prevođenje slike u matricu podataka za multivarijantnu analizu	42
3.4. Masena spektrometrija	43
3.4.1. UHPLC-LTQ Orbitrap MS/MS primenjena u analizi propolisa	43
3.4.2. Direktna analiza u realnom vremenu (Direct analysis in Real Time, DART) primenjena u analizi propolisa.....	44
3.5. Spektrofotometrijsko ispitivanje srpskog propolisa.....	45
3.5.1. Određivanje relativne antioksidativne aktivnosti srpskog propolisa DPPH.....	45
3.5.2. Određivanje sadržaja ukupnih fenola u propolisu	45
3.5.3. Određivanje sadržaja ukupnih flavonoida u srpskom propolisu	45
3.6. Ciklična voltametrija u analizi fenolnih jedinjenja iz propolisa.....	46
3. 7. Indukovano kuplovana plazma u analizi elemenata u propolisu.....	46
3.7.1. Mikrotalasna digestija.....	46
3.7.2. Analiza metala	46
3.8. Antimikrobna aktivnost propolisa.....	47
3.8.1. Materijal.....	47
3.8.2. Medijumi za gajenje bakterija	47
3.8.3. Antibiotici i reagensi korišćeni u MIC testu:	48
3.8.4. Pripremanje prekonoćnih kultura bakterija.....	48
3.8.5. Disk difuzioni test	49
3.8.6. Određivanje minimalne inhibitorne koncentracije (MIC)	49
3.9. Multivarijantne metode.....	51

4. NAŠI RADOVI 52

4.1. Fenolni profil srpskog propolisa određen visokoeфикаsnom tankoslojnom hromatografijom 52	
4.1.1. Fenolni profil srpskog propolisa na osnovu profila dobijenog ispitivanjem slike HPTLC hromatograma	58
4.1.2. Multivarijantna analiza slike hromatograma srpskog propolisa	60
4.1.3. Klasifikacija srpskog, slovenačkog i hrvatskog propolisa zasnovana na HPTLC analizi	70
4.1.4. Multivarijantna analiza nemačkog propolisa zasnovana na HPTLC.....	72
4.2. Spektrofotometrijsko ispitivanje fenolnog profila srpskog propolisa.....	76

4.2.1. UV/VIS spektri propolisa	76
4.2.2. Multivarijantna analiza UV spektara propolisa.....	78
4.3. Ispitivanje fenolnog sastava i antioksidativne aktivnosti propolisa cikličnom voltametrijom.	79
4.3.1. Ispitivanje cikličnih voltamograma i antioksidativne aktivnosti propolisa	79
4.3.2. Multivarijantna analiza rezultata dobijenih cikličnom voltametrijom.....	84
4.4. Određivanje fenolnog profila srpskog propolisa primenom orbitrap masene spektrometrije	85
4.4.1. Identifikacija fenolnih jedinjenja.....	85
4.4.2. Identifikacija flavan-3-ola.....	87
4.4.3. Identifikacija flavonola.....	87
4.4.4. Identifikacija flavanonola	88
4.4.5. Identifikacija flavona.....	88
4.4.6. Identifikacija flavanona.....	88
4.4.7. Identifikacija glikozida	89
4.4.8. Identifikacija fenolnih glicerida.....	91
4.4.9. Identifikacija derivata kafeinske kiseline i neidentifikovana jedinjenja	97
4.4.10. Kvantitativna analiza fenolnih jedinjenja u uzorcima propolisa	99
4.4.11. Multivarijantna analiza srpskog propolisa na osnovu sadržaja fenola.....	101
4.4.12. Multivarijantna analiza nemačkog propolisa zasnovana na DART.....	102
4.5. Sadržaj ukupnih fenola, flavonoida i relativna antioksidativna aktivnost	108
4.5.1. Sadržaj ukupnih fenola i flavonoida.....	108
4.5.2. Određivanje antioksidativne aktivnosti propolisa	108
4.5.3. Sadržaj metala i metaloida u srpskom propolisu.....	114
4.6. Određivanje antimikrobne aktivnosti propolisa.....	118
4.6.1. Disk-difuzioni metod.....	118
4.6.2. Određivanje minimalne inhibitorne koncentracije (MIC)	121
4.6.3. Bioautografija.....	128
4. 6. 4. Procena antimikrobne aktivnosti primenom HPTLC metode i multivarijantnih tehnika	130
4. 6. 5. Veza između antimikrobne aktivnosti i HTPLC rezultata	132
5. ZAKLJUČAK	139
6. REFERENCE.....	142
7. PRILOG.....	153

1. UVOD

Poslednjih godina raste interesovanje za ispitivanjem hemijskog sastava i farmakoloških svojstava propolisa u sinergiji sa primenom prirodnih proizvoda u farmaceutskoj, prehrambenoj i kozmetičkoj industriji. Propolis pokazuje širok spektar bioloških dejstava (antimikrobno, antioksidativno, antiinflamatorno, imunostimulatorno, antikancerogeno) te se od davnina koristi u narodnoj medicini.

Hemijski sastav propolisa, kao i sadržaj biološki aktivnih jedinjenja u njemu, zavisi od njegovog botaničkog i geografskog porekla, vrste pčela, kao i godišnjeg doba u kojem se prikuplja propolis. Zbog prethodno navedenog, razvoj pouzdanih analitičkih metoda u kombinaciji sa sofisticiranim multivarijantnim statističkim metodama za procenu autentičnosti i sistematsku karakterizaciju propolisa je aktuelna oblast fitohemije i prehrambene hemije.

Pregledom najnovije literature nameće se zaključak da srpski propolis do sada nije sistematično proučavan. Istraživanja i rezultati dobijeni u okviru ove doktorske teze su težnja za temeljnim i sistematičnim izučavanjem propolisa i davanjem smernica za uspostavljanje standarda kvaliteta propolisa iz Srbije i njegov plasman na domaćem i evropskom tržištu. Za ispitivanje hemijskog sastava propolisa se uglavnom koriste hromatografske tehnike kao što su visokoeфикасна течна hromatografija (**High Performance Liquid Chromatography, HPLC**) i gasna hromatografija (**Gas Chromatography, GC**) u kombinaciji sa masenim i ultravioletnim detektorima. Međutim, zbog niza prednosti kao što su brzina, niska cena i jednostavnost, visokoeфикасна tankoslojna hromatografija (**High Performance Thin-Layer Chromatography, HPTLC**) je zauzela značajno mesto u ispitivanju fenolnog profila propolisa u zavisnosti od njegovog botaničkog i geografskog porekla. Glavni nedostatak vizuelnog ispitivanja HPTLC fenolnog profila je subjektivnost analitičara. Za razliku od klasičnog pristupa, multivarijantne hemometrijske metode omogućavaju ispitivanje fenolnog profila zasnovano na preciznim matematičkim modelima. Metode multivarijantne analize, kao što su analiza glavnih komponenta

(Principal Component Analysis, PCA), klsterska analiza (Cluster Analysis, CA) i druge su korišćene za klasifikaciju uzoraka propolisa prema botaničkom i geografskom poreklu. Takođe, poređenjem fenolnog profila propolisa sa fenolnim profilom smola pupoljaka topole određeno je botaničko poreklo srpskog propolisa.

Pored fenolnog profila, sadržaj ukupnih fenola, flavonoida i antioksidativni kapacitet su osnovni pokazatelji kvaliteta propolisa. Ovi parametri se uglavnom određuju spektrofotometrijskim metodama. Potrebno je naglasiti da u današnje vreme i elektrohemijske metode zauzimaju značajno mesto u ispitivanju antioksidativnog kapaciteta propolisa, prvenstveno zbog brzine i niske cene analize. Pored navednog, sadržaj esencijalnih i toksičnih elemenata u propolisu ukazuje na stepen kvaliteta i bezbednost upotrebe propolisa. S obzirom da deo toksičnih metala prisutnih u propolisu potiče iz životne sredine, određivanje njihovog sadržaja u propolisu predstavlja pouzdan indikator zagađenja životne sredine. Kako svi prethodno pomenuti parametri određuju kvalitet i bezbednost primene, konkretno srpskog propolisa, ovo istaživanje bi moglo biti osnov za podsticaj povećane primene propolisa u industriji i, posledično, povećane ukupne proizvodnje propolisa.

Uprkos razlikama u hemijskom sastavu između različitih tipova propolisa, uslovljenim različitim botaničkim i geografskim poreklom, propolis ispoljava snažno antimikrobno dejstvo. Ovakva ispitivanja su značajna u pogledu primene propolisa kao prirodnog konzervansa u prehrambenoj industriji. Kao metode za određivanje antimikrobne aktivnosti propolisa primenjuju se disk-difuziona metoda i esej za određivanje minimalne inhibitorne aktivnosti (Minimal Inhibition Concentration, MIC). Osim toga, identifikacija pojedinih komponenata propolisa koje poseduju antimikrobna svojstva omogućena je tehnikom bioautografije [1].

Kao kratak rezime prethodno navedenog, može se podvući da je cilj istraživanja ove doktorske disertacije ispitivanje hemijskih, antioksidativnih i antimikrobnih svojstava srpskog propolisa primenom različitih hromatografskih, spektroskopskih, elektrohemijskih i hemometrijskih metoda. Metode multivarijantne hemometrijske analize su korišćene u cilju utvrđivanja veze između glavnih konstituenata srpskog propolisa i njihovog botaničkog i geografskog porekla. Takođe, jedan od ciljeva ove teze jeste da se poređenjem

hemijskih svojstava propolisa iz Srbije, Hrvatske, Slovenije, Nemačke i drugih evropskih zemalja, daju smernice u razvoju nove, pouzdane analitičke procedure za procenu autentičnosti evropskog propolisa.

2. OPŠTI DEO

2.1. Propolis kroz istoriju

Reč propolis potiče od grčkih reči „*pro*“, što znači pre, ispred i „*polis*“, što znači grad, zajednica. Ulaz u pčelinju košnicu je oblepljen propolisom, što ukazuje na poreklo reči propolis - „ispred grada“. Propolis ima značajnu ulogu u pčelinjem društvu i pčele ga koriste kao gradivni materijal za zatvaranje oštećenja i pukotina na košnici. Unutrašnji zidovi košnice su oblepljeni propolisom što obezbeđuje čistoću i sterilnost, zaštitu od štetočina i spoljašnjih faktora. Uginule pčele i tela uginulih štetočina pčele oblažu propolisom, tako se sprečava njihovo raspadanje, a samim tim i eliminiše izvor potencijalne infekcije pčelinjeg društva [2].

Propolis (pčelinji lepak) je lepljiva prirodna supstanca koja se dobija tako što pčele radilice (*Apis mellifera* L.) prikupljaju smole sa pupoljaka, lišća, drveća, i mešaju ih sa voskom i enzimima. Boja propolisa varira od žute do tamno smeđe, crvene ili zelene, što u mnogome zavisi od botaničkog i geografskog porekla, kao i sezone prikupljanja smola [3, 4].

Još su stari Egipćani primetili da pčele oblažu uginule štetočine propolisom, te su ga koristili kao sredstvo za mumifikaciju faraona. Grčki filozof Aristotel pominje propolis u svom delu „*Historia animalium*“ kao sredstvo za lečenje ogrebotina i rana [2], dok su stari Grci pravili parfeme mešajući propolis sa biljnim uljima [4]. Drevni arapski lekar Avicenna opisuje propolis kao supstancu jakog mirisa koja podstiče kijanje. On je znao da ga pčele koriste kao sredstvo za zatvaranje pukotina i oštećenja na košnici [4]. Propolis je korišćen od strane drevne civilizacije Inka, koristili su ga kao sredstvo za snižavanje telesne temperature [4]. Stari Rimljani su koristili propolis za pravljenje obloga za rane i prema nekim podacima koji datiraju iz tog vremena, propolis je imao višu cenu od meda [2].

U XIII veku u knjizi „*The Carbadini*“ autor preporučuje upotrebu propolisa protiv bakterija zubnog karijesa (*Caries dentium*) [5]. Između XVII i XX veka propolis je počeo intenzivno da se koristi u Evropi zbog svog antibakterijskog svojstva.

Krajem XX i početkom ovoga veka raste primena propolisa u farmaceutskoj, prehrambenoj i kozmetičkoj industriji, te u skladu sa tim raste i interesovanje za ispitivanje hemijskog sastava i bioloških svojstava propolisa [2, 4].

2.2. Prikupljanje propolisa

Tokom evolucije pojavile su se različite rase, pa i sojevi medonosnih pčela (*Apis mellifera* L.).

Danas je u naučnoj literaturi prihvaćeno gledište po kojem se mogu razlikovati samo četiri glavne rase medonosnih pčela, koje se morfološki i geografski lako izdvajaju. To su:

- *Apis mellifera mellifera* - tamna (crna) holandska i nemačka medonosna pčela,
- *Apis mellifera caucasica* - kavkaska (tamna i žuta) medonosna pčela,
- *Apis mellifera ligustica* - italijanska (žuta) medonosna pčela,
- *Apis mellifera carnica* - kranjska (siva) medonosna pčela.

Na području bivše Jugoslavije *Apis mellifera carnica* je zastupljena sa dva varijeteta, “sivka” i banatska žuta pčela. Ukrštanjem “sivke” i banatske pčele dobijeni su posebni ekotipovi medonosnih pčela: sjeničko-pešterska, rasinska, šarplaninska, homoljska, gorička [6]. Iako je karakteristična za područje Makedonije i Grčke, najnovija istraživanja ukazuju na rasprostranjenost podvrste *Apis mellifera macedonica* na jugu Srbije [7].

Pčele uglavnom krajem leta i početkom jeseni prikupljaju lepljivi biljni material za proizvodnju propolisa koji koriste za popunjavanje pukotina u košnici u cilju održavanja mikroklima i boljeg prezimljavanja pčelinjeg društva. Prema nekim autorima, samo nekoliko pčela radilica ne starijih od 15 dana prikuplja biljni materijal. One prikupljaju smolu tokom toplijeg dela dana, jer je tada smola mekana, i mešaju je sa pljuvačnim sokom koji sadrži enzime. Tako prerađenu biljnu smolu pčele u košnici mešaju sa voskom i dalje koriste kao gradivni i zaštitni materijal [4]. Zbog antifungalnog, antimikrobnog i antivirusnog svojstva, propolis čini košnicu jednom od najsterilnijih sredina u prirodi [8]. Tokom jednog leta, pčela radilica prikupi približno 10 mg propolisa. Jedno pčelinje društvo godišnje u proseku prikupi od 50 do 150 g propolisa [4].

2.3. Botaničko i geografsko poreklo propolisa

Biljni materijal koji pčele prikupljaju i koriste u proizvodnji propolisa su smole, lateks, gume i različite lipofilne supstance. Pomenuti biljni materijal služi biljkama kao zaštita od raznih nepovoljnih spoljnih faktora, kao što su, na primer, patogeni [2, 4]. Drevni rimski naučnik Plinius prvi je pretpostavio da pčele prikupljaju smolu sa pupoljaka topole, vrbe, bresta i drugog drveća. Nakon toga se u XV veku javljaju pretpostavke da propolis potiče od pupoljaka topole [4]. Za Evu Crane je određivanje botaničkog porekla propolisa predstavljalo izazov iz razloga što pčele prikupljaju propolis visoko u krošnjama drveća. Njeno istraživanje se zasnivalo na praćenju i posmatranju pčela [5]. Tek krajem dvadesetog veka, ruski botaničar Popavko je prvi poredio fenolni sastav propolisa sa fenolnim sastavom smole topole i breze i na osnovu toga došao do zaključka da ruski propolis potiče od navedenih biljnih vrsta [2, 3]. Poslednjih godina, mnoge studije su potvrdile rezultate do kojih su došli Plinius, Eva Crane i Popavko da evropski propolis uglavnom potiče od biljnih vrsta kao što su različite vrste topole *Populus sp.* (*Populus nigra*, *Populus tremula*, *Populus italica*), breza (*Betula sp.*), srebrna vrba (*Betula pendula*), brest (*Ulmus sp.*) i četinari. Od hemijskog sastava biljne smole zavisi i vrsta i količina biološki aktivnih jedinjenja u propolisu, a hemijski sastav biljnih smola je u direktnoj vezi sa klimatskim i fitogeografskim karakteristikama područja iz kojeg potiče [3]. U Tabeli 1 prikazana je lista potencijalnih biljnih izvora sa kojih pčele prikupljaju biljnu smolu i proizvode propolis.

Tabela 1. Lista potencijalnih botaničkih izvora propolisa [2, 5].

Redni broj	Botaničko ime	Region
1	<i>Betula pendula</i> Roth	Rusija
2	<i>Betula alba</i>	Rusija, Poljska
3	<i>Betula verrucosa</i>	Rusija
4	<i>Lychnis viscaria</i>	Rusija
3	<i>Helianthus annuus</i>	Britanija
6	<i>Cornus mas</i>	Rumunija
7	<i>Castanea sativa</i>	Francuska
8	<i>Quercus robur</i>	Francuska
9	<i>Calophyllum inophyllum</i>	Rusija
10	<i>Clusia major</i>	Vencuela
11	<i>Clusia minor</i>	Vencuela
12	<i>Dalbergia</i> sp.	Kuba, Meksiko, Brazil
13	<i>Laurus nobilis</i>	Italija
14	<i>Accacia</i> (neke vrste gumarabike)	Južna Afrika
13	<i>Sophora japonica</i>	Rumunija
16	<i>Althæraea rosea</i> .	Britanija
17	<i>Fraxinus</i>	SAD
18	<i>Fraxinus excelsior</i>	Nepoznat region
19	<i>Epilobium angustifolium</i>	Rusija
20	<i>Abies alba</i> Miller	Rumunija
21	<i>Prunus armeniaca</i>	Rumunija, Egipat
22	<i>Prunus aveum</i>	Rusija
23	<i>Prunus cerasifera</i>	Rumunija
24	<i>Prunus cerasus</i>	Rumunija
25	<i>Populus alba</i>	Evropa, Italija
26	<i>Populus angustifolia</i>	SAD
27	<i>Populus balsamifera</i>	SAD
28	<i>Populus canadensis</i>	Italija, Evropa
29	<i>Populus deltoides</i>	Južna Afrika
30	<i>Populus euroamericana</i>	UK, SAD
31	<i>Poplar nigra</i>	SAD, Evropa, Azija
32	<i>Poplar tremula</i>	Italija
33	<i>Populus trichocarpa</i>	Kanada
34	<i>Salix alba</i>	Rumunija
35	<i>Salix babylonica</i>	Egipat
36	<i>Salix caparea</i>	Rusija
37	<i>Salix cinerea</i>	Rumunija
38	<i>Larrea tridentata</i>	SAD
39	<i>Cistus</i> sp.	Tunis
40	<i>Aesculus hypocastane</i>	Mađarska

Na osnovu Tabele 1 može se zaključiti da pčele koriste veliki broj biljaka za proizvodnju propolisa. Različiti biogeološki faktori utiču na raznovrstan hemijski sastav biljnog materijala dostupnog pčelama za proizvodnju propolisa, te se propolisi iz različitih klimatskih zona međusobno razlikuju. Prema botaničkom i geografskom poreklu uzorci propolisa se mogu podeliti u sedam grupa [9].

Prema botaničkom i geografskom poreklu uzorci propolisa se mogu podeliti u sedam grupa [9] prikazanih u Tabeli 2.

Tabela 2. Podela propolisa prema botaničkom i geografskom poreklu [9].

Tip propolisa	Geografsko poreklo	Biljni izvor	Glavne komponente
Topola	Evropa, Severna Amerika, Novi Zeland, Azija	<i>Populus sp. (Poplar nigra, Poplar alba)</i>	Flavonoidi, fenolne kiseline i njihovi estri
Zeleni brazilski	Brazil	<i>Baccharis spp. Predominantly Baccharis dracunculifolia</i>	Prenilovani derivati <i>p</i> -kumarinske kiseline, Diterpenske kiseline
Crveni brazilski	Kuba, Brazil, Meksiko	<i>Dalbergia spp.</i>	Izoflavonoidi
Breza	Rusija	<i>Betula verrucosa</i>	Flavoni i flavonoli
Mediterranski	Sicilija, Grčka, Krit, Malta	<i>Cupressaceae</i>	Diterpeni
Clusia	Kuba, Venecuela	<i>Clusia spp.</i>	Poliprenilovani benzoifenoni
Pacifički	Pacifički region (Tajvan, Indonezija)	<i>Macaranga tanarius</i>	C-prenilovani flavanoni

Van H. Tran je 2012. godine identifikovao novu vrstu propolisa koji potiče od lepljivog eksudata australijske endemske vrste *Acacia paradoxa*. Ovaj propolis je interesantan zbog visokog sadržaja halkona i flavonoida [10].

Propolis koji potiče iz umereno kontinentalne zone (Evropa, Severna Amerika, Azija i Novi Zeland) je poznat kao propolis topola tipa. Glavni botanički izvori ovog tipa propolisa su različite vrste topole, *Populus sp.* Propolis topola tipa sadrži uglavnom fenolne kiseline, njihove estre i flavonoide. Fenoli karakteristični za ovaj tip propolisa su *p*-kumarinska kiselina, kofeinska kiselina, feniletil-estar kofeinske kiseline (Caffeic Acid

Phenethyl Ester, CAPE), pinocembrin, pinobanksin, galangin, krisin i kvercetin. Pored ovih komponenata propolis topola tipa sadrži i male količine glikozida, fenil glicerola, terpena i drugih jedinjenja. U Tabeli 3 je prikazan tipičan hemijski sastav propolisa topola tipa [9].

Tabela 3. Sastav sirovog propolisa topola tipa [4].

Komponenta propolisa	Jedinjenja
Balzam (40 - 70%), etanol-rastvorni deo propolisa topola tipa	Fenoli (fenolne kiseline i njihovi derivati, katehini, flavanoni, dihidroflavanoni, flavoni, flavonoli, halkoni, fenolni gliceridi). Alifatične kiseline, alkoholi, estri, aldehidi, ketoni, benzoeva kiselina i estri organskih kiselina
Terpenska ulja (3 - 5%), rastvorna u etanolu	Mono- i seskviterpeni
Vosak (20 - 35%), etanol-nerastvorni deo, potiče od pčelinjeg voska.	Komponente iz voska (alkoholi, kiseline, estri dugog alifatičnog niza)
Ostale supstance: 5%, supstance delimično rastvorne u etanolu, delovi pčela i polen	Uglavnom minerali sa sadržajem pepela oko 2,1%, polisaharidi (2%), proteini, amino-kiseline, amini, amidi, kao i tragovi ugljenih hidrata, laktona, steroida, vitamina

2.4. Hemijski sastav propolisa

Propolis ima kompleksan hemijski sastav i sadrži preko 300 različitih jedinjenja. Uglavnom je izgrađen od biljne smole (50%), voska (30%), esencijalnih ulja (10%), polena (5%) i ostalih organskih supstanci (5%). U propolisu se mogu identifikovati i minorne količine vitamina kao što su vitamin B1, B2, B6, C i E, amino kiselina, šećera i drugih supstanci. Pored navedenog, propolis sadrži i značajne količine metala kao što su Mg, Ca, K, Na, Cu, Zn, Mn i Fe [3]. Određeni autori navode da pčele prikupljaju biljni materijal na udaljenosti od 1 do 2 km od košnice [3, 5]. U nedostatku biljne smole, pčele prikupljaju bitumen i ulja antropogenog porekla, što je veoma značajno sa aspekta monitoringa zagađenja životne sredine [11].

2.4.1. Vosak

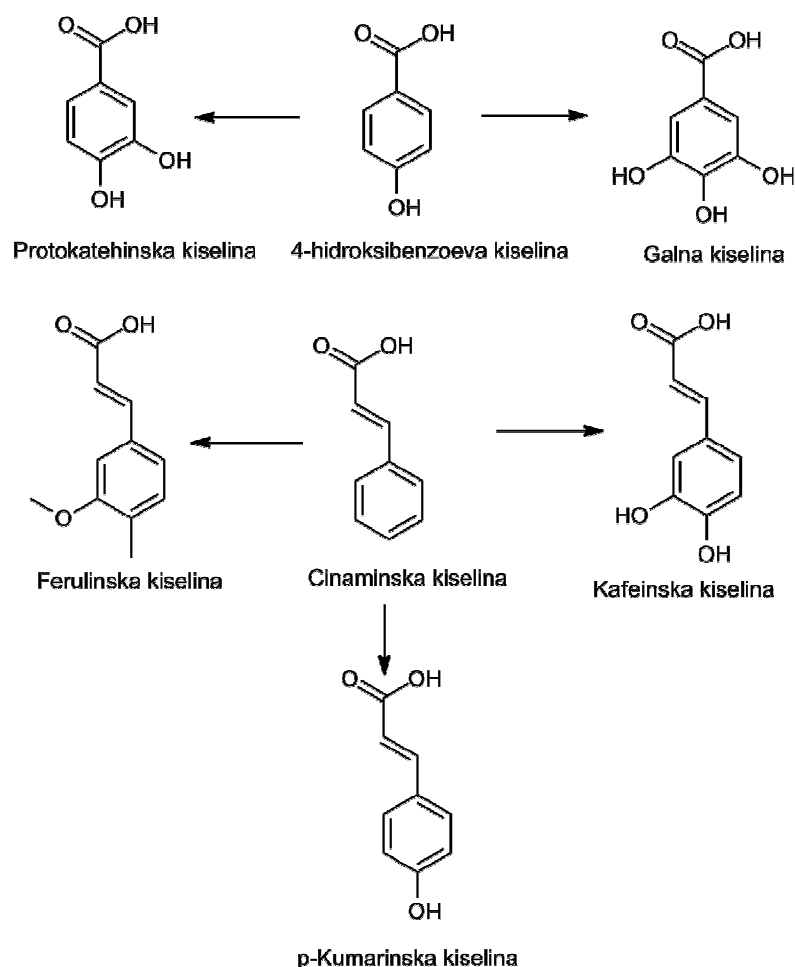
U literaturi postoji mali broj publikacija koje se odnose na hemijski sastav pčelinjeg voska i on uglavnom zavisi od vrste pčela. Pčelinji vosak je kompleksna smeša nepolarnih jedinjenja dugog alifatičnog niza kao što su alkani, alkeni, alkadieni, alkoholi, masne kiseline i njihovi estri. Od ugljovodonika, najzastupljeniji su alkani i alkeni izgrađeni od 27, 29, 31 i 33 atoma ugljenika. Najzastupljeniji primarni alkoholi u vosku medonosne pčele su izgrađeni od 24, 30 i 34 atoma ugljenika. Organske kiseline koje su identifikovane u većim količinama u pčelinjem vosku su arahidonska, oleinska, linolna, palmitinska, stearinska i cerotinska kiselina [12, 13]. Vosak je često kontaminiran pesticidima pri čemu ova kontaminacija većim delom potiče od hemijskih sredstava koja se koriste u zaštiti pčela od grinje varoe (*Varroa destructor*), a manjim delom iz životne sredine [14].

2.4.2. Fenolna jedinjenja karakteristična za propolis

Fenolna jedinjenja predstavljaju sekundarne metabolite biljaka široko rasprostranjene u prirodi. Zbog širokog spektra farmakoloških dejstava kao što su antioksidativno, antimikrobno, antitumorsko, fenoli sve više privlače pažnju velikog broja naučnika [15]. Do sada je identifikovano oko 8000 prirodnih jedinjenja koja pripadaju grupi fenola. Fenoli štite biljke od štetnog UV zračenja i patogena. Boja voća, povrća, cveća, pčelinjih proizvoda potiče od fenolnih jedinjenja. Pčelinji proizvodi predstavljaju bogat izvor fenolnih jedinjenja [15, 16]. Na primer, sadržaj flavonoida u medu iznosi oko 6 mg/kg, u polenu 0,5%, a u propolisu čak 10% [17].

Fenoli su organska jedinjenja izgrađena od jednog ili više aromatičnih prstenova supstituisanih hidroksilnim grupama. Prema hemijskoj strukturi fenoli se mogu podeliti na fenolne kiseline i flavonoide. Fenolne kiseline u svom sastavu sadrže karboksilnu grupu, za razliku od flavonoida koji su izgrađeni od $C_6-C_3-C_6$ skeleta. U prirodi se fenoli mogu naći u slobodnom (aglikoni), metilovanom, hidroksilovanom i glikozidnom obliku [15, 16]. Fenolne kiseline se u prirodi nalaze u obliku derivata hidroksibenzoeve (C_6-C_1) i hidroksicinaminske (C_6-C_3) kiseline. Iako je osnovni skelet molekula isti, položaj karboksilne grupe u velikoj meri menja hemijska i biološka svojstva molekula [15].

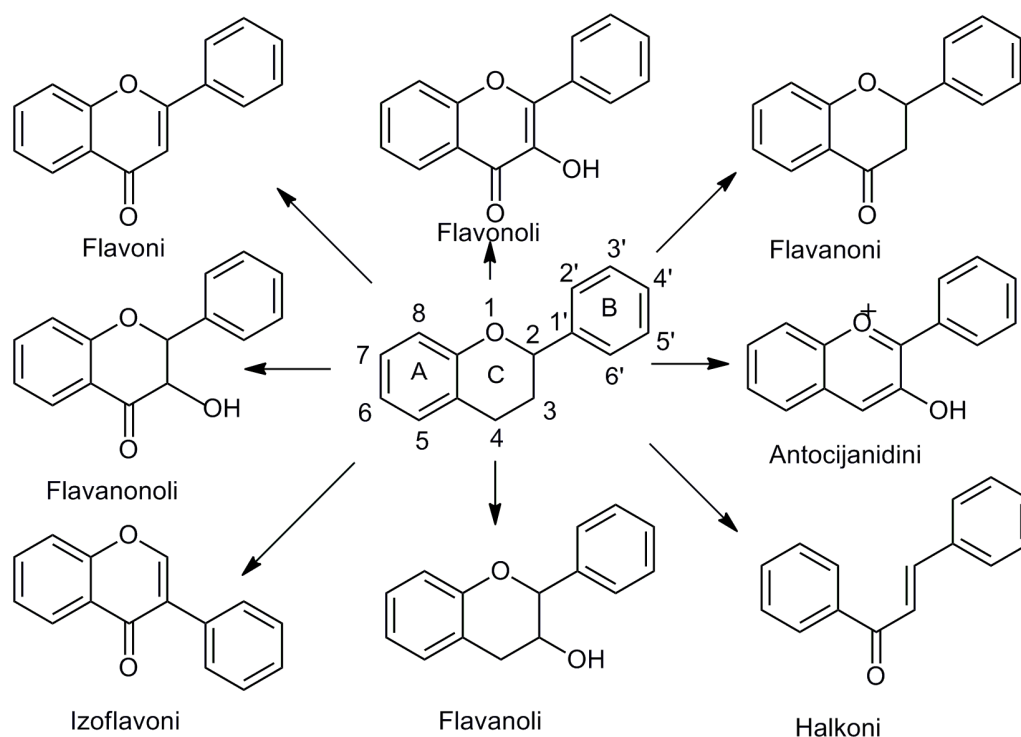
Veliki broj fenolnih kiselina je identifikovan u propolisu. Fenolne kiseline karakteristične za propolis topola tipa su galna, kofeinska, *p*-kumarinska, ferulinska, protokatehinska kiselina. Pored navedenih, često se mogu naći derivati fenolnih kiselina u obliku estara sa kininskom kiselinom (npr. 3-*O*-kofeoil kininska kiselina). Na Slici 1 prikazane su hemijske strukture nekih fenolnih kiselina identifikovanih u propolisu [9].



Slika 1. Fenolne kiseline karakteristične za propolis topola tipa, izvedene iz hidroksibenzoeve i cinaminske kiseline.

Flavonoidi nastaju biosintezom od prekursora šikinske kiseline. Prema strukturnim razlikama flavonoidi se mogu podeliti na osam grupa: flavonoli, flavani, flavanoni, katehini, antocijanidini, izoflavoni, dihidroflavonoli i halkoni. Osnovni skelet flavonoida je prikazan na Slici 2. Flavonoidi su izgrađeni od tri benzenova prstena i, u zavisnosti od položaja supstituenata na A, B i C prstenu, menjaju se hemijska i farmakološka svojstva

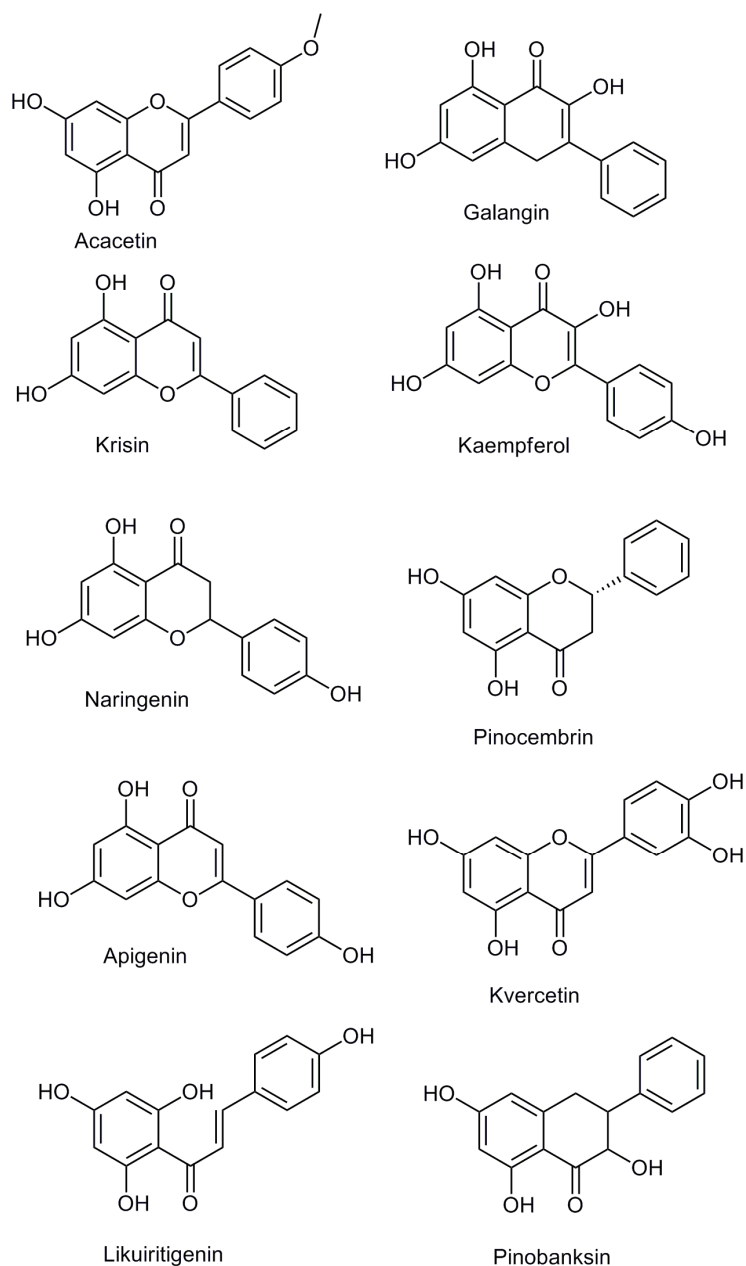
molekula [15, 16]. Flavonoli i flavoni imaju dvostruku vezu između C-2 i C-3 i ne sadrže supstutuent na prstenu B. Flavoni takođe ne sadrže hidroksilnu grupu na C-3 atomu. Karakteristični flavoni za propolis topola tipa su kvercetin, luteolin, apigenin, tektokrisin, acacetin i krisin [9, 16]. Flavan-3-oli nemaju keto-grupu na C-4 atomu i sadrže dva stereocentra na drugom i trećem C-atomu. Vodeni ekstrakt kineskog propolisa sadrži katehine i njegove derivate kao tipične flavon-3-ole [18].



Slika 2. Osnovni skelet flavonoida.

Flavanoni ne sadrže dvostruku vezu između atoma C-2 i atoma C-3 na C prstenu. Flavanoni identifikovani u propolisu topola tipa su pinostrombin, pinocembrin, naringenin karakteristični za propolis topola tipa [9, 16]. Flavanonoli, kao i flavanoni, ne sadrže dvostruku vezu C2-C3 na C prstenu, dok se, sa druge strane, na C-2 atomu nalazi hidroksilna grupa. Veliki broj studija ukazuje na prisustvo flavanonola u propolisu topola tipa, kao što su pinobanksin i njegovi derivati. Na Slici 3 su prikazane hemijske strukture nekih flavonoida identifikovanih u propolisu topola tipa. Takođe, fenolna jedinjenja kao što

su izoflavoni, flavanoli i flavanonoli su identifikovani u propolisu [9]. Ugljeni hidrati koji sa fenolima grade glikozide i ulaze u sastav propolisa, su heksoze (glukoza i galaktoza), pentoze (arabinoza i ksiloza) i deoksiheksoza (ramnoza) [19]. Interesantno je da su u holandskom propolisu identifikovani fenolni gliceridi bez supstituenta na B-prstenu [9].



Slika 3. Hemijske strukture flavonoida karakterističnih za propolis topola tipa.

2.5. Biološka svojstva propolisa

Propolis ispoljava širok spektar bioloških svojstava, antimikrobno dejstvo je možda najznačajnija karakteristika propolisa i u prilog ovome govori veliki broj publikacija [20]. Fenolne kiseline i flavonoidi značajno doprinose antioksidativnoj i antimikrobnoj aktivnosti propolisa [2]. U daljem tekstu biće navedena samo neka od najvažnijih bioloških dejstava propolisa.

2.5.1. Antimikrobna aktivnost propolisa

Uprkos razlikama u hemijskom sastavu propolisa različitog botaničkog i geografskog porekla, svi tipovi imaju izraženu antimikrobnu aktivnost. Antibakterijska aktivnost propolisa je ispitivana na širokom spektru aerobnih i anaerobnih, Gram-pozitivnih i Gram-negativnih bakterija. Pokazano je da je propolis aktivniji prema Gram-pozitivnim bakterijama, ali ipak pokazuje i inhibitorna svojstva prema nekim Gram-negativnim bakterijama [20]. Takođe, propolis deluje i protiv različitih parazita, kvasaca, gljiva i virusa. Antimikrobna aktivnost sirovog propolisa uglavnom opada sa njegovim produženim stajanjem i dužim skladištenjem. Nasuprot ovome, potvrđeno je da etanolni ekstrakt propolisa, čuvan 10 do 15 godina, pokazuje povećanu antibakterijsku aktivnost [21]. Stepanović i saradnici su ispitivali antimikrobnu aktivnost ekstrakata srpskog propolisa, prema odabranim mikroorganizmima kao i sinergijski efekat srpskog propolisa i izabranih antibiotika. Dobijeni rezultati ovog istraživanja pokazali su snažan antimikrobni efekat etanolnog ekstrakta srpskog propolisa prema Gram-pozitivnih bakterija pojedinačno i u kombinaciji sa komercijalnim antibioticima [22].

2.5.2. Antioksidativna aktivnost propolisa

Tokom normalnih fizioloških procesa, kao i u stresnim uslovima, u ljudskom organizmu dolazi do proizvodnje reaktivnih molekula ili atoma, poznatijih kao slobodni radikali koji lako dalje reaguju sa drugim molekulima. Antioksidansi su hemijska jedinjenja koja mogu sprečiti ili usporiti oksidaciju biomolekula od strane slobodnih radikala. Disbalans između nastalih slobodnih radikala i antioksidanasa dovodi do oksidativnog

oštećenja na ćelijskom nivou, kao što je peroksidacija membranskih lipida, oksidativno oštećenje nukleinskih kiselina i šećera, sulfonskih i drugih grupa u proteinima [23]. Slobodni radikali su molekuli koji imaju nesparene elektrone, nose veliku količinu energije, što ih čini reaktivnim, jer teže da predaju višak energije drugim biomolekulima. Slobodni radikali kao što su superoksid radikali ($O_2^{\cdot-}$), hidroksil radikal (OH^{\cdot}), perhidroksi radikal (HO_2^{\cdot}) i alkoksi radikali (RO^{\cdot}) koji imaju nesparen elektron na atomu kiseonika pripadaju grupi reaktivnih kiseoničnih vrsta (ROS, eng. *Reactive Oxygen Species*). Sa druge strane, postoje i neradikalske vrste kao što su vodonik peroksid (H_2O_2), singlet kiseonik (1O_2) i ozon (O_3). Nedostatak antioksidanasa koji mogu neutralisati reaktivne slobodne radikale je potencijalni uzrok nastanka bolesti, kao što su kardiovaskularna oboljenja, kancer, neurodegenerativne bolesti, kao i inflamatorna oboljenja. Veliki broj sintetičkih antioksidanasa kao što su butilovani hidroksitoluen (BHT) i butilovani hidroksianizol (BHA) je našao primenu u prehrambenoj industriji. Međutim, smatra se da su upravo sintetički antioksidansi odgovorni za nastanak mnogih oboljenja povezanih sa oštećenjem jetre i kancerogenezom [23]. U poslednje vreme velika pažnja se posvećuje primeni prirodnih antioksidanasa u fitoterapiji u cilju lečenja mnogih bolesti. Prisustvo antioksidanasa kao što su fenolne kiseline i flavonoidi, opravdava primenu meda, propolisa i matičnog mleča u fitoterapiji, kao moćnih prirodnih antioksidanasa. Jedinjenja koja poseduju veliki antioksidativni potencijal su fenolne kiseline i njihovi derivati (kofeinska kiselina, CAPE), flavonoidi (kvercetin, galangin), a upravo su oni konstituenti propolisa. Antioksidativni potencijal fenolnih kiselina i flavonoida se ogleda u njihovoj sposobnosti da lako predaju atom vodonika [20, 23].

Antikancerogena aktivnost propolisa je ispitivana od strane velikog broja autora. Brazilski propolis ispoljava snažan *in vitro* efekat na linije humanih kancerskih ćelija (kancera pluća, prostate, bubrega, leukemije). Dokazano je da komponente iz propolisa topola tipa, kao što su feniletil-estar kofeinske kiseline, kofeinska kiselina, apigenin, kvercetin ispoljavaju snažno antikancersko i antitumorsko dejstvo [2, 20]. Veliki broj studija bavi se proučavanjem imunostimulatornog dejstva propolisa. Ovo dejstvo propolisa se ogleda u aktivaciji limfocita i povećanoj sintezi antitela. Takođe, propolis deluje na makrofage tako što stimuliše njihovu litičku aktivnost. Imnostimulatorna svojstva

ispoljavaju brazilski zeleni propolis, propolis topola tipa, kao i preparati propolisa (kapsula) i feniletil-estar kofeinske kiseline [20].

2.6. Kontrola kvaliteta i standardizacija propolisa

U zapadnoevropskim zemljama, kao na primer u Nemačkoj i Švajcarskoj, propolis se uglavnom koristi kao dodatak ishrani, dok se u Sjedinjenim Američkim Državama, Japanu, Brazilu, mahom koristi u farmaceutskoj industriji. Kvalitet propolisa se procenjuje na osnovu njegovih senzorskih i fizičko-hemijskih svojstava [4].

Senzorska svojstva propolisa su [4]:

- konzistencija: na temperaturi od 30 °C propolis je mek i lepljiv, ispod 13 °C je tvrd i krt,
- miris: prijatan, podseća na smolu drveća,
- ukus: oštar, gorak,
- boja: zavisi od botaničkog porekla: smeđežuta, smeđezelena, smeđecrvena, tamno crvena.

Fizička svojstva propolisa su [4]:

- gustina,
- tačka topljenja,
- rastvorljivost: slabo je rastvoran u vodi, ali rastvoran u smeši rastvarača (etanol-hloroform, etanol-toulen).

Kvalitetan propolis bi morao da ispunjava sledeće uslove [4]:

- da ima nizak sadržaj mehaničkih nečistoća (drvo, delovi pčela),
- ne sadrži ili u veoma niskim koncentracijama sadrži toksične metale i pesticide,
- poseduje visok sadržaj smole,
- poseduje visok sadržaj biološki aktivnih jedinjenja (u zavisnosti od tipa propolisa, tj. botaničkog porekla),
- ima nizak sadržaj voska (25-30%) [4].

Prvi korak u proceni kvaliteta propolisa je određivanje njegovog botaničkog porekla. Sledeći korak se odnosi na kvantitativno određivanje komponente koja je svojstvena za sve tipove propolisa. Jedan od predloga za standardizaciju kvaliteta propolisa

od strane Bankove, je sadržaj feniletil-estara kofeinske kiseline. Propolis topola tipa pored galangina, krisina, pinocembrina, sadrži prethodno navedeno jedinjenje u većoj količini, za razliku od brazilskog propolisa u kojem je feniletil-estar kofeinske kiseline prisutan u maloj količini ili ispod granice detekcije. Iz prethodno navedenog se nameće zaključak da nije jednostavno postaviti kriterijume standardizacije kvaliteta, odnosno procene kvaliteta propolisa koji se odnose na sve tipove propolisa [4, 24].

2.7. Analitičke metode za ispitivanje hemijskog sastava propolisa

Postoji veliki broj analitičkih tehnika koje se koriste za ispitivanje hemijskog sastava propolisa. U okviru ove doktorske disertacije biće dat pregled onih tehnika koje su korišćene za ispitivanje hemijskog sastava propolisa u okviru ove studije, a to su:

- Tankoslojna hromatografija,
- Masena spektrometrija (Orbitrap masena spektrometrija visoke rezolucije, direktna analiza u realnom vremenu (Direct analysis in real time, DART)),
- UV/VIS spektrofotometrija,
- Ciklična voltametrijia,
- Indukovano kuplovana plazma optičko emisiona spektroskopija.

2.7.1. Tankoslojna hromatografija

Tankoslojna hromatografija je podvrsta tečne hromatografije. Kao i kod svih hromatografskih tehnika, hromatografski sistem se sastoji od stacionarne, mobilne faze i ispitivane supstance (analita). Stacionarna (nepokretna) faza ima svojstvo da vezuje molekule analita na osnovu različitih mehanizama, među kojima su dominantni adsorpcija i podela (particija). Uopšteno govoreći, prema načinu pakovanja stacionarne faze, razlikuju se kolonska (kod koje je stacionarna faza pakovana u koloni) i planarna hromatografija (kod koje je stacionarna faza smeštena na ravnoj površini, nosaču od stakla, aluminijuma ili plastike). Mobilna (pokretna) faza ili eluent, prolazi kroz stacionarnu fazu (tanak sloj ili kolonu) noseći sa sobom molekule analita različitom brzinom u zavisnosti od hemijskih i fizičkih svojstava analita [25]. Tokom ovog procesa dolazi i do procesa adsorpcije i

desorpcije komponenata analita i njihove raspodele između dva faze. Postupak razdvajanja se može posmatrati kao sekvencijalni proces u kojem se migracija analita ponavlja kroz čitavu stacionarnu fazu sve dok uzorak ne napusti sistem (u slučaju kolonske hromatografije) ili rastvarač ne dostigne određeni nivo na ploči (tankoslojna hromatografija). Različiti fizički i hemijski faktori određuju mehanizam sorpcije, koji uključuje adsorpciju, particiju, jonsku izmenu i ekskluziju [25].

Zadržavanje, odnosno retencija jedinjenja u ovom hromatografskom sistemu se izražava kao retardacioni (retencioni) faktor:

$$R_F = \frac{a}{b},$$

gde je a dužina puta koji je prešla analizirana supstanca i b dužina puta rastvarača. Na osnovu R_F vrednosti, mogu se dobiti informacije o polarnosti, spektralnim svojstvima (apsorbancija, fluorescencija), veličini molekula ispitivanog analita [26].

Poslednjih decenija dvadesetog veka razvijen je veliki broj komercijalno dostupnih visokoefikasnih stacionarnih faza, te automatizovanih uređaja, kombinovanih sa velikim brojem masenih detektora što je značajno proširilo primenu tankoslojne hromatografije na različite oblasti industrije i nauke. Na ovaj način je prvobitni princip tankoslojne hromatografije zamenjen visokoefikasnom tehnikom koja, zbog svoje jednostavnosti, brzine i niske cene, predstavlja jednu od osnovnih metoda u analizi organskih i neorganskih jedinjenja u mnogim laboratorijama širom sveta [25-27].

Uprkos manjoj moći razdvajanja u odnosu na visokofikasnu tečnu hromatografiju i gasnu hromatografiju (Gas Chromatography, GC), primena elektronskih filtera prilikom obrade slike hromatograma ili posthromatografska selektivna derivatizacija povećavaju rezoluciju razdvajanja. Međutim, otvoren sistem kod HPTLC metode onemogućava analizu isparljivih i nestabilnih jedinjenja (sklonih oksidaciji, termolabilnih ili fotosenzitivnih). Uprkos ovome, HPTLC metoda ima niz prednosti, kao što su [26]:

- jednostavna priprema uzorka,
- širok opseg koncentracija analita preko 10 000 (0,1 µl - 1 ml),

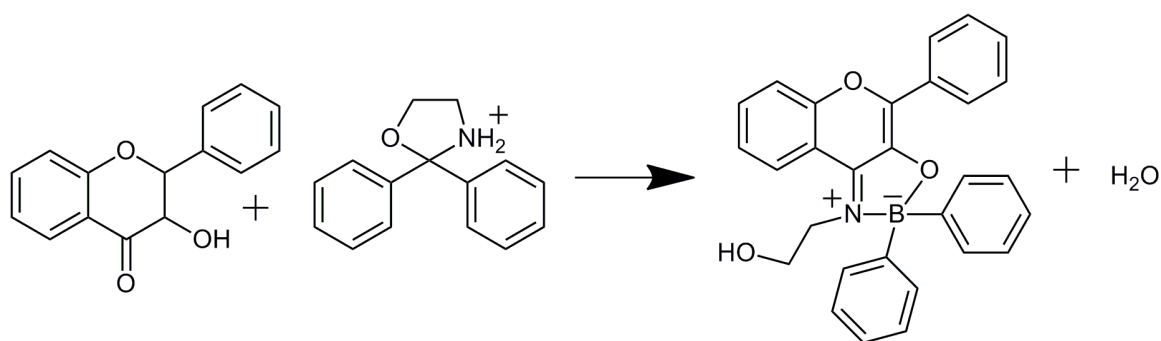
- komponente iz uzorka koje se nalaze na početku ploče nakon završetka analize se mogu identifikovati, sto nije slučaj kod kolonskih tehnika kod kojih se razdvojene komponente tek nakon prolaska kroz detektor mogu identifikovati,
- mogućnost paralelne hromatografske analize: preko 70 uzoraka simultano,
- tokom sukcesivnih analiza, kod HPTLC metoda ne dolazi do promena adsorbenta kao što je to slučaj kod HPLC i GC, jer se za svaku narednu analizu koristi svež adsorbent,
- svi uzorci se analiziraju pod identičnim eksperimentalnim uslovima,
- sve komponente analizirane smeše se mogu čuvati i, ako su stabline, mogu se kasnije analizirati, što nije slučaj kod HPLC i GC metode,
- hromatogram se može koristiti za različite vrste detekcije: UV apsorpciju (vidljiva oblast spektra, 254 nm, 366 nm), fluorescentna, masena spektroskopija, hemijska derivatizacija, biološka detekcija,
- dobijeni hromatogram je bogat izvor podataka te stoga pogodan za multivarijantnu analizu [28].

Postoji više različitih načina klasifikacije sorbenata koji se koriste u TLC. Najpraktičnija je podela prema hemijskoj prirodi sorbenta na sorbente sa uniformnim hemijskim karakteristikama (silika-gel, aluminijum-oksidi, celuloza, poliamid) i sorbente sa kombinovanim hemijskim karakteristikama (modifikovani silika-gel) [29].

Najčešće korišćeni sorbent sa uniformnim karakteristikama je silika-gel. Silika-gel je silicijum dioksid kod kojeg je svaki atom silicijuma okružen sa četiri atoma kiseonika gradeći tetraedar. Na površini silika-gela atomi kiseonika povezani su ili sa vodonikom (-Si-OH, silanolna grupa) ili sa drugim atomom silicijuma (-Si-O-Si-, siloksanska grupa). Silanolni aktivni centri se mogu u izvesnoj meri razlikovati, u zavisnosti od toga da li se javljaju kao izolovani ili vezani (tj. slobodni, vicinalni ili geminalni). Sve silanolne grupe ponašaju se kao proton-donori, dok siloksanske grupe imaju proton-akceptorska svojstva. U uslovima normalno-fazne (NP) hromatografije supstanca se raspodeljuje između izrazito polarne stacionarne faze i manje polarne mobilne faze [29]. Sorbenti sa kombinovanim hemijskim karakteristikama dobijaju se reakcijom površinskih silanolnih grupa silika-gela sa različitim organskim i organo-silikonskim jedinjenjima. U zavisnosti od primenjenog organskog liganda dobijaju se hidrofobni (nepolarni) ili hidrofilni (polarni) sorbenti. Među

hidrofilno-modifikovanim silika-gelovima najveću primenu u hromatografiji na tankom sloju imaju cijano-propil- (CN), amino-propil- (NH_2) i diol-modifikovani silika-gelovi [29].

U cilju identifikacije hromatografskih zona koje odgovaraju fenolnim jedinjenjima, hromatogram se derivatizuje prskanjem ili uranjanjem u rastvor za derivatizaciju. Tako derivatizovan hromatogram daje zone iste ili različite boje, što zavisi od selektivnosti reagensa za derivatizaciju. Fenolna jedinjenja u reakciji sa rastvorom gvožđe (III)-hlorida grade različito obojena kompleksna jedinjenja (ljubičasto do oranž) u zavisnosti od hemijske strukture [30].



Slika 3. Reakcija između Neu-ovog reagensa i flavonoida [30].

Takođe, 2-aminoetil-estar difenilborne kiseline u kombinaciji sa polietilen-glikolom se koristi kao selektivniji reagens za derivatizaciju fenolnih jedinjenja. Hemijska reakcija između fenola i reagensa za derivatizaciju je prikazana na Slici 3. 2-Aminoetil difenilborat je još poznat kao Neu-ov reagens [30].

2.7.2. Masena spektrometrija

Masena spektrometrija je jedna od najviše korišćenih analitičkih tehnika u fitohemijskim istraživanjima, posebno kada su u pitanju kompleksni biološki uzorci. Glavna prednost masene spektroskopije u odnosu na ostale tehnike je visoka osetljivost (koja se ogleda u mikrogramskim količinama uzorka) i analize kompleksne smeše prirodnih jedinjenja. Povezivanje kapilarne elektroforeze i hromatografskih metoda sa širokim spektrom masenih detektora povećava osetljivost i selektivnost masene detekcije [31]. Prvi korak tokom analize molekula masenom spektrometrijom je jonizacija. Jonizator je uređaj koji pod dejstvom spoljašnje energije prevodi molekule u jone. Ispitivani molekul

daje fragment najveće molekulske mase, koji odgovara „molekulskom jonu“ i može poticati od M-H, ili M+H jonizacije. Prilikom jonizacije može doći do fragmentacije molekula na manje fragmente. Tako nastali fragmenti daju informacije o strukturi i fragmentacionom mehanizmu ispitivanih molekula. Mase nastalih fragmenata se mogu porediti sa masama fragmenta standardnog jedinjenja nastalim pod istim uslovima ili literaturnim vrednostima za to jedinjenje. Sledeći korak pri analizi molekula masenom spektroskopijom je razdvajanje nastalih jona ili fragmenata u analizatoru na osnovu odnosa mase/naelektrisanja (m/z). Na kraju, razdvojeni fragmenti dalje odlaze na detektor [32].

Postoje različite tehnike jonizacije od kojih je elektrosprej jonizacija (**Electro Spray Ionization**, ESI) jedna od najviše korišćenih tehnika. Kod ove tehnike jonizacije ispitivani molekul se nalazi u obliku vodenog rastvora. Ova tehnika je našla primenu pre svega u analizi makro- i mikro- molekula [31].

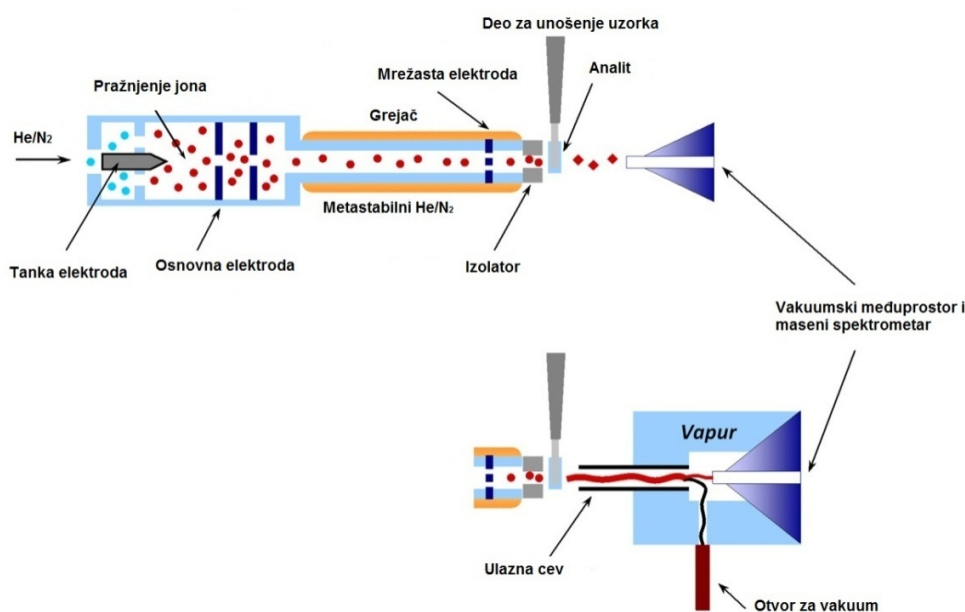
Razvoj novih ambijentalnih jonizatora kao što su hemijska jonizacija pri atmosferskom pritisku (**Atmospheric Pressure Chemical Ionization**, APCI), brzo bombardovanje atoma (**Fast Atom Bombardment**, FAB), direktna analiza u realnom vremenu (**Direct Analysis in Real Time**, DART), desorpcija elektrosprej jonizacija (**Desorption Electrospray Ionization**, DESI) omogućavaju veoma brzu analizu uzorka pri ambijentalnim uslovima. Glavna prednost ovih jonizatora je brzina, laka priprema uzorka (u većini slučajeva bez pripreme), kao i mogućnost kuplovanja sa tankoslojnom hromatografijom [33].

2.7.2.1. Direktna analiza u realnom vremenu

Poslednjih godina primena DART jonizacionog izvora privukla je pažnju velikog broja naučnika zbog niza prednosti kao što su:

- brzina,
- veoma jednostavna priprema ili bez pripreme uzoraka,
- zanemarljiv uticaj matriksa,
- širok spektar gasovitih, tečnih i čvrstih uzoraka,
- laka interpretacija masenih spektara [33].

Direktna analiza u realnom vremenu je prvi put uvedena od strane američkog naučnika Cody-ja 2003 godine [34]. DART je prvo korišćen kao veoma brza tehnika koja ne zahteva pripremu uzorka za analizu molekula male molekulske mase. Uzorci se uvode direktno u jonski izvor, u mnogim slučajevima uz pomoć pinceta i štapića za analizu tečnih i čvrstih uzoraka [33]. Metoda je ograničena na analizu molekula čija masa ne prelazi 1000 Da. Ova tehnika nije prilagođena za analizu molekula velike molekulske mase, što znači da se molekuli matriksa ne mogu jonizovati i na taj način je uticaj matriksa minimiziran [33]. Gasovi visoke čistoće, kao što su He, N₂, H₂ ulaze u jonski izvor pri električnom potencijalu od +1 do +5 kV. To stvara pražnjenje koje sadrži jonizovani gas, elektrone, ekscitovane atome/molekule i druge metastabilne vrste. Potencijal od 100 V uz pomoć elektrofiltera otklanja naelektrisane čestice iz struje čestica, te se samo pobuđeni molekuli ulivaju u treću komoru. Nastale pobuđene vrste direktno reaguju sa molekulima uzorka, koji može biti u sva tri agregatna stanja. Tako formirani joni analita, pod dejstvom toka gasa i blagog vakuuma odlaze u maseni analizator [33, 34]. Šematski je DART jonizacija prikazana na Slici 4.



Slika 4. Šematski prikaz DART jonizacije.

2.7.2.2. Orbitrap maseni analizator

U današnje vreme veliki broj analizatora je u upotrebi. To omogućava precizno određivanje mase i fragmenata analiziranih molekula. Jonizovani molekuli nastali u jonizatoru, odlaze u analizator. Analizator ima ulogu separatora jona na osnovu odnosa mase i naelektrisanja (m/z). Kvadrupolni analizator se sastoji od četiri dijagonalno povezane valjkaste elektrode između kojih se propuštaju joni. Na paralelne valjkaste elektrode je priključen izvor naizmenične struje, pri čemu jedan par elektroda ima pozitivan, a drugi negativan polaritet. Joni koji ulaze u analizator imaju različite vrednosti m/z i u zavisnosti od primenjene struje i električnog polja, mogu zadržati stabilnu putanju i proći analizator ili dotaknuti elektrode i postati neutralni molekuli.

Pored gore navedenog veliku pažnju u analizi fenola privlače i drugi analizatori kao što su: jon ciklotronska rezonancija ili FTMS (Fourier Transform Mass Spectrometry), TOF analizator (Time Of Flight), jonska zamka (Ion Trap, IT), Orbitrap [31].

U Orbitrap-u joni se tangencijalno uvode u električno polje gde se zadržavaju u prostoru između dve elektrode. Elektrostatičko privlačenje je izbalansirano centrifugalnom silom, te joni specifičnog odnosa m/z kruže oko centralne elektrode stvarajući prstenove. Frekvencija ovih harmonijskih oscilacija je nezavisna od brzine jona i obrnuto proporcionalna kvadratnom korenu m/z [35].

Postoji niz prednosti koje poseduje Orbitrap u odnosu na ostale analizatore, a to su [35]:

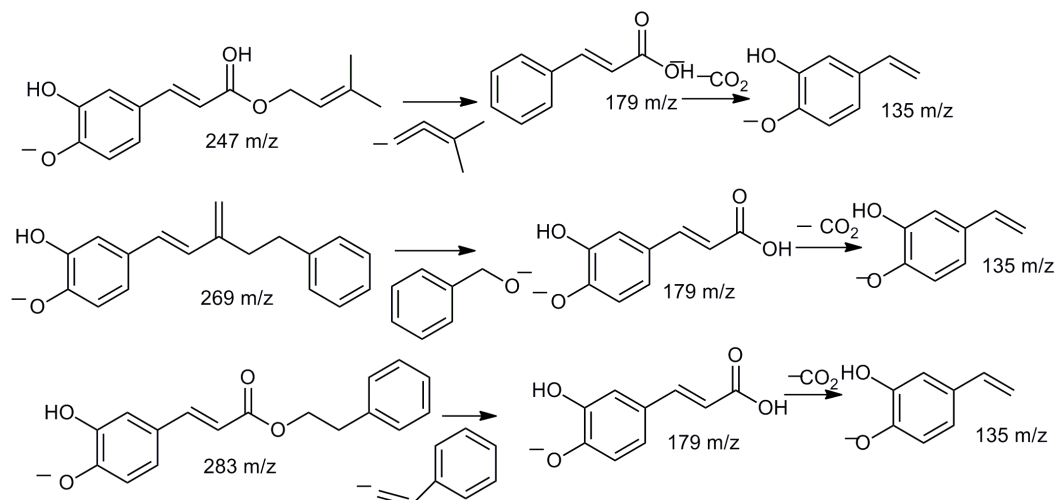
- mogućnost preciznog određivanja mase molekula (na 5 decimala),
- visoka rezolutivna moć (preko 200 000),
- širok dinamički opseg,
- mogućnost određivanja kvantitativne razlike poznatih jedinjenja na osnovu selektivnog m/z odnosa,
- kombinovanje kvalitativne i kvantitativne analize,
- veoma osetljiv detektor (određuje jako male mase reda veličine ppb, bez dodatka internog standarda),
- analiza ekstremno složenih smeša [35].

2.7.2.3. Masena fragmentacija fenolnih kiselina i flavonoida

U literaturi postoji veliki broj studija koje se odnose na fragmentaciju flavonoida i fenolnih kiselina karakterističnih za propolis. Negativnom jonizacijom fenolnih kiselina obično nastaju fragmenti koji odgovaraju gubitku molekula ugljenik (IV)-oksida (44 Da) i vode (18 Da). Metil-derivati fenolnih kiselina (ferulinska kiselina) fragmentacijom gube CH_3 grupu (15 Da), dok se estri fenolnih kiselina fragmentišu raskidanjem estarske veze između alkohola i fenolnih kiselina. Mogući mehanizmi fragmentacije estara fenolnih kiselina prisutnih u propolisu su prikazani na Slici 5 [36-38].

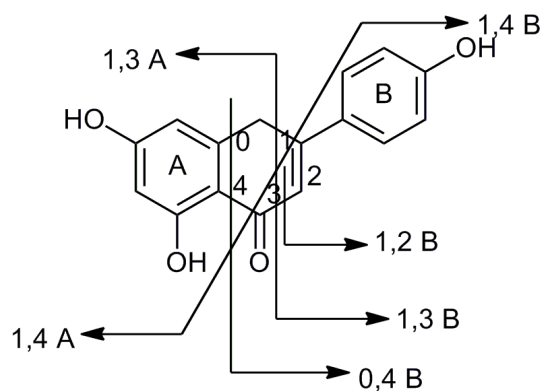
Flavonoidi podležu specifičnom obrascu fragmentacije poznatijem kao retro *Diels-Alder*-ov (RDA) mehanizam. U cilju lakšeg tumačenja masenih spektara uvedena je nomenklatura koja nedvosmisleno opisuje jone nastale fragmentacijom. Prema RDA mehanizmu, raskidanjem C-C veze C-prstena nastaju fragmenti $[\text{}^{i,j}\text{A}]^-$, $[\text{}^{i,j}\text{B}]^-$, gde i i j označavaju položaj veze koja se raskida. Ovi fragmenti mogu biti korišćeni za određivanje broja i prirode supstituenata na A⁻ i B⁻ prstenovima fragmentisanog flavonoida. Na primer, raskidanjem 1,3 veze C-prstena flavonola dolazi do stvaranja $[\text{}^{1,3}\text{A}]^-$ i $[\text{}^{1,3}\text{B}]^-$ jona koji su karakteristični za jedinjenja kao što su kvercetin, kamferol, morin, ramnetin i druga [36].

Kempferol i galangin, kao tipični flavonoli propolisa topola tipa, RDA fragmentacijom grade $[\text{}^{1,2}\text{A-CO}]^-$ i $[\text{}^{1,3}\text{A}]^-$ jone pri čemu galanin gubi C_2O_2 grupu i daje fragment na m/z 215. Prilikom fragmentacije kvercetina nastaju fragmenti na m/z 273, 257, 229 koji odgovaraju gubitku CO (28 Da), CO_2 (44 Da) i C_2O_3 (76 Da). Identifikovan je i pik na m/z 107, koji odgovara fragmentu $[\text{}^{1,2}\text{A-CO-CO}_2]^-$ [36, 38]. Flavoni identifikovani u propolisu topola tipa, kao što su apigenin, acacetin i luteolin, daju fragmente $[\text{}^{1,3}\text{A}]^-$, $[\text{}^{1,3}\text{B}]^-$ i $[\text{}^{0,4}\text{A}]^-$. Pored toga, prilikom negativne jonizacije luteolin i krisin fragmentacijom gube $\text{CO}_2\text{-CO}$ grupu koja odgovara masi od 72 Da. Naringenin, kao predstavnik flavanona identifikovan u ekstraktima propolisa, fragmentacijom gradi karakteristične jone $[\text{}^{1,3}\text{A}]^-$, $[\text{}^{1,3}\text{B}]^-$, i $[\text{}^{0,4}\text{A}]^-$ prema gore opisanom RDA mehanizmu (Slika 6). Takođe, naringenin gubi i sledeće grupe CH_3 (15 Da), CO-CO (56 Da), $\text{CO}_2\text{-CO}$ (72 Da) [36, 38].



Slika 5. Mogući fragmentacioni mehanizmi prenil estra kofeinske kiseline, feniletil estra kofeinske kiseline i benzil estra kofeinske kiseline [37].

Flavoni daju karakterističan fragment $[^{0,3}B]^-$. U jednoj od studija je ispitivana fragmentacija nekoliko flavona i izoflavona, pri čemu je utvrđeno da izoflavoni daju fragment $[^{0,4}B]^-$, a flavoni $[^{1,3}A]^-$ [37]. Fragmentacija flavonoid-glikozida je opisana od strane Doman-a i Kostelo-a [39].



Slika 6. Diels Alder-ov mehanizam fragmentacije flavonoida [38].

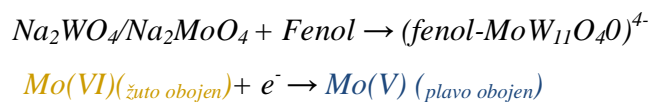
2.7.3. UV/VIS spektrofotometrijsko ispitivanje propolisa

2.7.3.1. UV/VIS spektri fenolnih jedinjenja

Fenolna jedinjenja apsorbuju u UV/vis delu spektra zbog prisustva aromatičnih prstenova, pri čemu prisustvo hidroksilnih grupa, šećernih jedinica i drugih supstituenta u molekulu flavonoida, dovodi do batohromnog ili hipsohromnog pomeranja maksimuma apsorpcije. Flavonoide karakterišu dva elektronska prelaza, prelaz I karakterističan za prsten B koji se javlja u opsegu talasnih dužina od 500 nm do 550 nm, i prelaz II karakterističan za prsten A koji se javlja u opsegu talasnih dužina od 240 nm do 283 nm. Talasne dužine I i II prelaza za veliki broj flavonoida su prikazane u literaturi [40].

2.7.3.2. Određivanje sadržaja ukupnih fenola i flavonoida

Ukupan sadržaj fenola i flavonoida predstavlja jedan od parametara kvaliteta propolisa koji se najčešće određuje spektrofotometrijskim tehnikama. Metoda za određivanje sadržaja ukupnih fenola se zasniva na reakciji između Folin Ciocalteu-ovog (FC) reagensa i fenolnih jedinjenja koja ulaze u sastav ispitivanog uzorka. Folin Ciocalteu-ov reagens predstavlja smešu fosfomolibdenske i fosfovolframove kiseline. Redukcijom određenim hemijskim agensima (flavonoidi, fenolne kiseline) molibden (+VI) i volfram (+VI) prelaze u niža oksidaciona stanja (+V) gradeći takozvano molibdenensko plavo. Niže su prikazane jednačine hemijskih reakcija fenolnih jedinjenja i FC reagensa [41]:

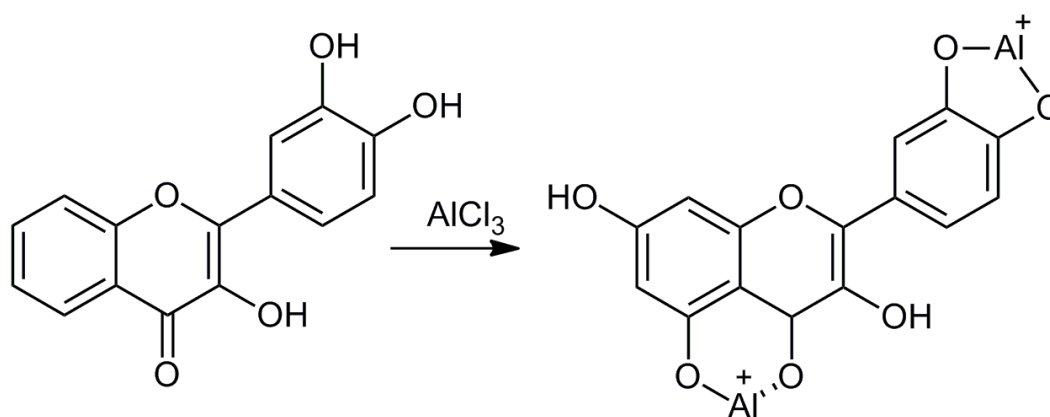


U hemijskoj reakciji između FC reagensa i fenolnih jedinjenja nastaje plavo obojen kompleks koji ima maksimum apsorpcije na talasnoj dužini od 763 nm. Ukupan sadržaj fenola se obično izražava preko ekvivalenata galne kiseline (mg EGK/g propolisa).

Folin Ciocalteu reagens se godinama unazad koristio za određivanje sadržaja fenola u poljoprivrednim, farmaceutskim i prehrambenim proizvodima. Sa druge strane, novije studije ukazuju na neselektivnost FC reagensa koja se ogleda u reakciji sa amino

kiselinama, proteinima, nukleotidima, nezasićenim masnim kiselinama, aminima, vitaminima, aldehydima i ketonima [42].

Ukupan sadržaj flavonoida u propolisu se najčešće određuje kompleksometrijskom metodom, koja se zasniva na hemijskoj reakciji između rastvora aluminijum-hlorida i fenola pri čemu dolazi do građenja obojenog kompleksa aluminijuma. Flavoni i flavonoli sa aluminijum-hloridom formiraju kompleks koji intenzivno apsorbuje na $\lambda = 415$ nm, dok flavanoni slabo apsorbuju na ovoj talasnoj dužini. Na Slici 7 je prikazana hemijska reakcija između fenola i rastvora aluminijum-hlorida. Ukupan sadržaj flavonoida se obično izražava preko ekvivalenta katehina (mg CE/g propolisa) ili kvercetina (mg QE /g propolisa) [43].

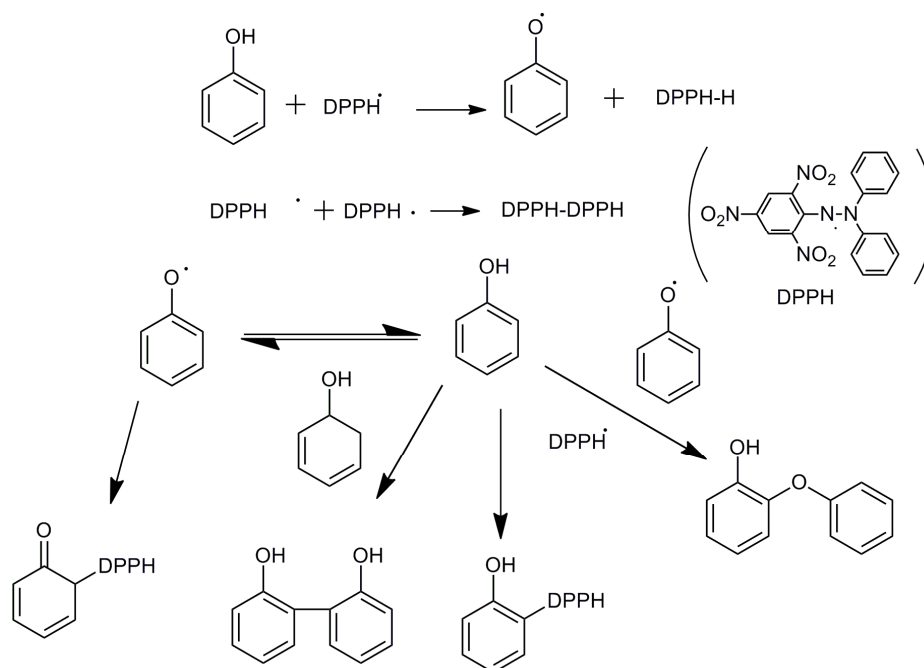


Slika 7. Jednačina hemijske reakcije kompleksiranja aluminijuma rastvorom flavonoida [40].

2.7.3.3. Određivanje antioksidativne aktivnosti propolisa

Najčešće korišćene metode za određivanje antioksidativne aktivnosti su ORAC (**O**xxygen **R**adical **A**bsorbance **C**apacity), FRAP (**F**erric **R**eduction **A**ntioxidant **P**ower), CUPRAC (**C**upric **R**educing **A**ntioxidant **P**ower) i merenje smanjenja apsorbancije DPPH (2,2-difenil-1-pikrilhidrazil) radikala. DPPH metoda za određivanje antioksidativne aktivnosti omogućava merenje sposobnosti supstanci ili prirodnih ekstrakata da neutrališu nesparene elektrone atoma vodonika formiranjem manje reaktivnih vrsta. Na Slici 8 prikazan je jedan od predloženih mehanizama reakcije DPPH radikala i fenolnih jedinjenja. Ispitivanje antioksidativnog kapaciteta se zasniva na reakciji hromogenog jedinjenja radikalne prirode sa antioksidansima [44].

DPPH je komercijalno dostupan organski dugoživeći radikal, tamno ljubičaste boje. Kada se pomeša ispitivani antioksidans sa rastvorom DPPH, boja ljubičastog rastvora DPPH se menja u žutu što odgovara boji hidrazina, te se može spektrofotometrijski meriti apsorbancija u opsegu talasnih dužina od 515 do 528 nm. DPPH je fotosenzitivan i rastvara se u organskim rastvaračima, što ograničava upotrebu reagensa za određivanje antioksidativne aktivnosti hidrofilnih antioksidanasa [44].



Slika 8. Potencijalne reakcije između DPPH i fenolnih jedinjenja [45, 46]

Tumačenje rezultata može biti kompleksno ako analit sadrži jedinjenja čiji se apsorpcioni spektri preklapaju sa apsorpcionim spektrom DPPH na 515 nm (karotenoidi, eugenol) [44]. Relativna antioksidativna aktivnost se računa prema sledećoj formuli:

$$RAA (\%) = \left(\frac{A_{DPPH} - A_{UZORKA}}{A_{DPPH}} \right) \cdot 100$$

gde je A_{DPPH} apsorbanciju rastvora DPPH, dok je A_{uzorak} apsorbancija smeše uzorka i DPPH.

2.7.4. Ciklična voltametrija fenolnih jedinjenja

Ova tehnika se zasniva na povratnoj linearnoj promeni elektrodnog potencijala od početne do vrednosti za krajnji potencijal, zatim do vrednosti potencijala gašenja, pri čemu vrednost potencijala gašenja ne mora da bude identična početnom potencijalu [47]. Na taj način je postignuta mogućnost određivanja potencijala karakterističnih za fenolna jedinjenja ispitivanih uzoraka propolisa u širokom opsegu potencijala.

Polazni oksidacioni potencijal je obično elektrodni na kojem se ne odigrava proces oksidacije i u toku snimanja elektrodni potencijal se pomera prema pozitivnijim vrednostima. Za proces redukcije polazi se od elektrodnog potencijala na kojem nema redukcije, zatim se elektrodni potencijal menja prema negativnijim vrednostima. Nakon postizanja konačne vrednosti elektrodnog potencijala, koja se za primer oksidacije obično postavlja na vrednost manju od potencijala oksidacije rastvarača ili osnovnog elektrolita, elektrodni potencijal se vraća do potencijala gašenja [47].

Danas je u upotrebi čitav niz različitih materijala koji se koriste za proizvodnju elektroda najčešće od platine, zlata, srebra i različitih tipova ugljenika (staklasti ugljenik, grafit i dr.). Veličina elektroda obično iznosi nekoliko milimetara (posmatrajući prečnik disk elektrode) [47].

U voltametrijskim eksperimentima se najčešće koriste tri elektrode, radna pomoćna i referentna. Radna i pomoćna elektroda su dovoljno razdvojene, dok je referentna elektroda postavljena blizu radne elektrode i sadrži Haber-Ludtinov-u kapilaru da bi se smanjio gubitak otpora. U ćelijama sa dobrim mešanjem posle snimanja u većini sličajeva se može isti rastvor koristiti za više određivanja bez zamene rastvora. Širok opseg rastvarača (nevodenih i vodenih) i pomoćnih elektrolita (obično koncentracije 0,1 M) uključujući i popularne tetraalkilamonijum-soli, se koriste za voltametrijska ispitivanja. S obzirom da je ispitivana supstanca najčešće koncentracije reda veličine 10^{-4} M ili čak i manje, tragovi nečistoća mogu imati štetan uticaj na voltametrijska određivanja. Izbor rastvarača i pomoćnog elektrolita zavisi od toga za šta se koristi kao i od rastvorljivosti ispitivanog analita [47].

Od svih elektroanalitičkih tehnika ciklična voltametrija je našla najveću primenu u ispitivanju antioksidativnog kapaciteta. Najznačajniji parametri za određivanje

antioksidativnog kapaciteta primenom ciklične voltametrije su: vrednost intenziteta anodne struje (I_{a2}) koja je proporcionalna koncentraciji komponenata u uzorku, oksidacioni potencijal (E_{pa}), i površina pod anodnim talasom (Q). Ovi parametri su primenjeni za procenu antioksidativnog kapaciteta i imaju različita hemijska značenja. E_{pa} vrednost izražava redoks svojstva antioksidansa, dok se I_a i Q vrednosti odnose na količinu prenosa naelektrisanja. Površina pod anodnim talasom je predložena kao bolji parametar za procenu antioksidativnog kapaciteta nego I_a . Međutim, i odnos između prethodno navedenih parametara (E_{pa}/Q) se često koristi za procenu kapaciteta antioksidansa [48].

Pored gore navedenih, središnji potencijal (E_{sred}), koji odgovara potencijalu između anode i katode, i polutaladni potencijal ($E_{p/2}$) se koriste za procenu antioksidativne aktivnosti u slučaju odsustva povratnog katodnog potencijala, kao što je to slučaj kod galne kiseline [48].

Vodeni ekstrakti indijskog propolisa su pokazali veću antioksidativnu aktivnost poređenjem sa etanolnim ekstraktom primenom ciklične voltametrije [49]. Buratti i saradnici su razvili amperometrijsku protočnu injekcionu metodu za ispitivanje antioksidativne aktivnosti pčelinjih proizvoda, i ustanovili da propolis pokazuje najveću antioksidativnu aktivnost u poređenju sa drugim pčelinjim proizvodima [50]. Rebiai je proučavao antioksidativnu aktivnost alžirskog propolisa poređenjem sa elaginskom i askorbinskom kiselinom kao standardom [51].

Ciklična voltametrija u kombinaciji sa hemometrijskim tehnikama postaje aktuelna oblast hemije hrane. Pigani je razvio metodu za klasifikaciju vina primenom ciklične voltametrije i multivarijantnih metoda [52].

2.7.5. Određivanje sadržaja metala

Sadržaj metala u propolisu predstavlja važan parametar sa stanovišta životne sredine, jer je stabilan i zavisi isključivo od tipa zemljišta. Toksični metali prisutni u zemljištu i vodi potiču iz antropogenih izvora i mogu kontaminirati pčelinje proizvode. Olovo i kadmijum su najviše proučavani toksični metali. Kadmijum biljke apsorbuju iz zemljišta te može kontaminirati nektar i pčelinje proizvode. Olovo je rasprostranjeno u vazduhu i potiče uglavnom od izduvnih gasova motornih vozila, tako da direktno može kontaminirati nektar

i med. Generalno, olovo se ne transportuje u biljkama. Pčelinji proizvodi su značajni bioindikatori zagađenja životne sredine. Ostali toksični metali, kao što su živa i nikl su manje ispitivani i samo nekoliko studija je objavljeno na ovu temu. Poslednjih godina raste interes za ispitivanje načina i stepena kontaminacije pčelinjih proizvoda toksičnim metalima [11].

Primena indukovano kuplovane plazme sa optičkom emisijom spektrometrijom (Inductively Coupled Plasma Optical Emission Spectrometry, ICP-OES) kako u kvalitativnoj tako i u kvantitativnoj analizi ima brojne prednosti u odnosu na ostale tehnike. Pored prednosti kvantitativnog određivanja velikog broja elemenata, jedna od možda najvažnijih prednosti je mogućnost simultane multielementalne analize za relativno kratko vreme [53]. Kako su na raspolaganju talasne dužine različitih osetljivosti, ostvarena je mogućnost detekcije širokog opsega koncentracije, tj. tehnika poseduje širok linearni dinamički opseg (LDR) analitičke krive (4-6 redova veličine). Prednost tehnike se ogleda u mogućnosti da se jedan te isti element može analizirati i kao glavna komponenta i kao trag pomoću iste analitičke krive. ICP-OES je karakterističan po niskim granicama detekcije, reda veličine 1-100 ppb, zahvaljujući visokoj temperaturi koja omogućava efikasnu atomizaciju, jonizaciju i ekscitaciju većine elemenata Periodnog sistema [53].

Postoji mali broj publikacija koje se odnose na ispitivanje sadržaja toksičnih i esencijalnih metala u propolisu. Esencijalni i toksični metali su određeni u uzorcima propolisa sakupljenih u devet različitih regiona Hrvatske. Ova istraživanja ukazuju da hrvatski propolis ne sadrži toksične metale iznad dozvoljenih vrednosti [54].

2.8. Ispitivanje antimikrobne aktivnosti propolisa

2.8.1. Disk difuzioni metod

Difuzione metode se uglavnom koriste u početnom „skrining“ testu antimikrobne aktivnosti, gde se testirana supstanca prenosi u bunarić na hranljivoj podlozi (Well diffusion method) ili na filter disk (Filter paper disc diffusion method), odakle se difuzijom radijalno širi po podlozi. Zona odsustva rasta (zona inhibicije) nastaje oko diska ili bunarića kao posledica određene koncentracije testirane supstance koja dovodi do zaustavljanja rasta

bakterija. Izražava se u milimetrima i meri se kao prečnik zone inhibicije. Izmereni prečnik zone inhibicije i stepen osetljivosti bakterija je izražen na tri moguća načina: nema inhibicije (-), zona inhibicije do 8 mm (+), od 8 do 12 (++) , zona veća od 12 (+++) [1, 55].

2.8.2. *Određivanje minimalne inhibitorne koncentracije (MIC, minimal inhibition concentration)*

Određivanje minimalne inhibitorne koncentracije se primenjuje prilikom ispitivanja antimikrobnih svojstava prirodnih proizvoda, uključujući sirove ekstrakte, hromatografski izdvojena jedinjenja kao i prečišćena jedinjenja. Metoda je brza, osetljiva, relativno jeftina, pouzdana i pomoću nje je moguće utvrditi minimalne inhibitorne i baktericidne koncentracije antimikrobnih agenasa. Resazurin služi kao indikator ćelijskog rasta, koji se, pored MIC eseja, koristi u mnogim drugim testovima. U oksidovanom obliku resazurin je plave boje i nije fluorescentan niti toksičan, te je iz tog razloga našao veliku primenu. U prisustvu ćelijskog rasta, delovanjem ćelijskih oksidoreduktaza, redukuje se u fluorescentan rezorufin koji je ružičaste boje [1, 55].

Difuzionim metodama je moguće ispitati osetljivost bakterija prema određenoj supstanci, ali metoda je kvalitativna. Za razliku od difuzionih, dilucione metode su i kvantitativne, jer je njima moguće utvrditi MIC ispitivanih uzoraka. MIC je najniža koncentracija ispitivane supstance koja zaustavlja rast bakterija, dok se najniža koncentracija koja izaziva smrt bakterija označava kao minimalna baktericidna koncentracija (MBC) [1, 55].

2.8.3. *Bioautografija*

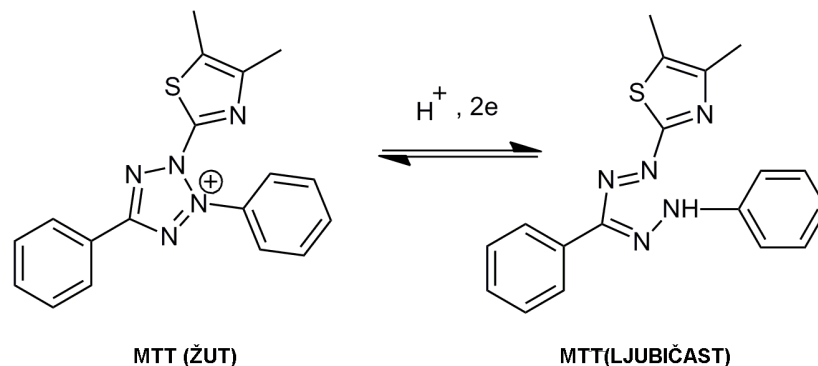
Bioautografija je analitička metoda kod koje se jedinjenja prethodno razdvojena na hromatografskoj ploči detektuju primenom živih organizama, a poznata je još od davne 1946. godine [1]. Iako bioautografija uglavnom uključuje žive organizme (bakterije, plesni, gljive, ćelijske organele i enzime) ova metoda je pogodna i za ispitivanje antioksidativne aktivnosti [1].

TLC-bioautografija esej se može posmatrati kao jednostavna “*on-line*” ili “*in situ*” metoda koja omogućava razdvajanje jedinjenja u slučaju složenih smeša, ekstrakata kao i

imobilizaciju biološki aktivnih komponenata na TLC ploči [56]. Za razliku od klasičnih mikrobioloških testova koji ne prave razliku između aktivnih i neaktivnih komponenata prisutnih u analitu, ova metoda identifikuje komponente koje poseduju antimikrobnu aktivnost. Zone ispitivanih jedinjenja su lako dostupne jer su planarni sistemi otvoreni i dostupni za inkubacije bakterijskih kultura, enzima ili ćelijskih organela. Glavne prednosti TLC bioautografije su:

- brz “skrining” velikog broja uzoraka
- određivanje biološke aktivnosti, izolovanje aktivnih jedinjenja
- određivanje IC50 vrednosti čistih jedinjenja.

Postoje različite tehnike bioautografije, kao što su direktne i indirektne. Direktnom bioautografijom hromatogram se isprska, ili potapa u suspenzije gljivica ili bakterija. Direktna bioautografija se primenjuje na mikroorganizme koji mogu da rastu direktno na TLC ploči. Na Slici 10 je prikazana redukcija 3-(4,3-dimetiltioazol-2-il)-2,3-difeniltetrazolijum bromida (MTT) nakon reagovanja sa potencijalnom zonom od interesa. Zone inhibicije (žute boje) su posmatrane u odnosuna ljubičastu pozadinu [1, 56, 57].



Slika 10. Redukcija MTT reagensa [56].

2.9. Hemometrijske metode

2.9.1. Analiza glavnih komponenata (PCA)

Analiza glavnih komponenata (**P**roduct **C**omponent **A**nalysis, PCA) je najčešće primenjivana multivarijantna metoda koja ima za cilj grupisanje ispitivanih uzoraka prema sličnosti, formiranje takozvanih glavnih komponenata, koje nastaju linearnom kombinacijom osnovnih varijabli. Dalje, PCA pruža mogućnost određivanja spoljnih vrednosti, tj. uzoraka koji se po hemijskim karakteristikama razlikuju od ostalih te se obično odstranjuju iz seta podataka. PCA se može definisati kao metoda pomoću koje se formira novi koordinatni sistem sačinjen od međusobno normalnih latentnih varijabli (glavnih komponenata) usmerenih u pravcu najvećeg varijabiliteta među podacima. Multidimenzionalni sistem koji se sastoji iz velikog broja dimenzija (varijabli u ovom slučaju) se nakon primene PCA metode svodi na dve ili tri dimenzije [58].

PCA se zasniva na pronalaženju pravca među varijablama koji na najbolji način odražava relativno rastojanje između objekata i opisuje maksimum varijanse skorova. Skorovi predstavljaju projekcije vrednosti podataka na latentnu varijablu, odnosno pravac [60]. Ovaj pravac je poznat kao prva glavna komponenta ($PC1$) i definiše se pomoću vektora koeficijenata latentnih varijabli (loading vector). Druga glavna komponenta ($PC2$) predstavlja pravac normalan na $PC1$ kojim se opisuje maksimum preostalog varijabiliteta među podacima. Sve dalje glavne komponente su normalne na prethodne i njihov pravac pokriva varijanse među podacima projektovane na posmatrani pravac. Ukupan broj glavnih komponenata jednak je broju varijabli [60, 61].

Broj glavnih komponenata se najčešće određuje pomoću grafika zavisnosti broja komponenata od varijanse PCA skorova [60]. Naime, varijable za koje se zna da sadrže malu količinu informacija, posle standardizovanja postaće značajne koliko i varijable koje sadrže značajnije informacije. Iz tih razloga se početni set podataka tretira postupkom centriranja, autoskaliranja ili normiranja u odnosu na srednju vrednost ili autoskalira na nulu srednje vrednosti i jedinicu varijanse pre početka PCA [58, 59].

2.9.2. *Klasterska analiza i toplotna mapa*

Klasterska analiza je klasifikaciona metoda kojom se pronalaze grupe sličnih objekata (u prostoru promenljivih), ili promenljive (u prostoru objekata) ili obe istovremeno. Ova metoda pretpostavlja da su informacije o strukturi grupa sadržane u podacima, ali da i određeni objekat, odnosno varijabla, ne pripada samo jednoj grupi, već može biti deo dve ili više grupa [61]. Klasterska analiza često daje rezultate koje je teško objasniti, u smislu sličnosti objekata ili varijabli, zbog čega su u literaturi predloženi mnogi algoritmi koji se zasnivaju na različitim principima. Najznačajnije metode klasterske analize su sledeće: particiona metoda, hijerarhijska metoda, metoda rasplinutog klasterovanja (Fuzzy clustering methods), metoda grupisanja po određenom modelu, u kojoj različiti klasteri prate određeni model, kao što je multivarijantna normalna distribucija sa određenom srednjom vrednošću i kovarijansom [60, 61].

Odgovarajuća grafička prezentacija rezultata ima izgled dendrograma. Na dobijenom grafiku je moguće odrediti optimalan broj klastera i videti hijerarhijski odnos između različitih grupa objekata, odnosno varijabli. Hijerarhijska metoda je najčešće korišćena metoda za klastersku analizu. U okviru nje postoje dve procedure za formiranje klastera:

- Aglomerativna metoda,
- Metoda razdvajanja (separaciona metoda) [58].

Razdvajanje ili spajanje klastera u pomenutim hijerarhijskim metodama zasniva se na sličnostima i udaljenosti između klastera. Udaljenost između dva klastera određuje se različitim pravilima od kojih se najčešće koristi Vardovo (Ward) pravilo. Sve pomenute metode predstavljaju funkciju rastojanja između objekata, odnosno varijabli, kao što su euklidovska razdaljina, menhetn (Manhattan) razdaljina, Minkovski (Minkowski) ili Mahalanaobisova (Mahalanobis) razdaljina [58]. Rastojanje između objekata 1 i 2 računa se primenom euklidovske razdaljine koja se definiše kao:

$$d_{12} = [(x_{11} - x_{12})^2 + (x_{12} - x_{22})^2]^{1/2}$$

Toplotna mapa je grafički prikaz hijerarhijske klasterske analize kod koje su vrednosti pojedinih varijabli prikazane kao matrica u kojoj su individualne vrednosti varijabli (uzoraka) predstavljene preko intenziteta boja. Na osnovu intenziteta boje može se

zaključiti o uticaju pojedinih varijabli (fenola, antioksidativne, antimikrobne aktivnosti uzoraka) na grupisanje uzoraka. Pored toga, ova metoda prikazuje klasifikaciju varijabli i uzoraka istovremeno u obliku 2D grafika [62] .

2.9.3. Metoda delimičnih najmanjih kvadrata (PLS) i metoda delimičnih najmanjih kvadrata sa diskriminantnim pristupom (PLS-DA)

Metoda delimičnih najmanjih kvadrata (PLS) je jedna od najčešće korišćenih hemometrijskih metoda zajedno sa multilinearom regresijom (**M**ultiple **L**inear **R**egression, MLR) i regresijom glavnih komponenti (**P**roject **C**omponent **R**egression, PCR). PLS se zasniva na linearnom modelovanju kod kojeg se matrica X projektuje na mali broj tzv. latentnih varijabli (LV). Posledica toga je da PLS istovremeno pronalazi varijable koje pokazuju visoku varijansu i visoko su korelisane sa zavisno promenljivom Y . Broj latentnih varijabli u PLS modelu se određuje unakrsnom validacijom [61, 63].

Vrednosti značajnih projektovanih varijabli (Variable Importance in Projection, VIP) prepoznaju promenljive koje su značajne za dobijanje odgovarajućeg PLS modela. Obično se varijable sa VIP vrednostima koje su veće od 1 smatraju značajnim, dok se one sa vrednostima nižim od 1 mogu isključiti iz modela, što ne utiče na smanjenje njegovih predikcionih karakteristika [61].

Metoda delimičnih najmanjih kvadrata se primenjuje u cilju klasifikacije uzoraka primenom diskriminantnog pristupa (PLS-DA). Za ovu analizu vektor klase se konstruiše za jednu varijablu svake klase sa vrednošću **1**, ako uzorak pripada određenoj klasi, i **0** ako ne pripada [61]. Dobijene latentne varijable (LV) razdvajaju klase jedne od drugih. Ako je broj varijabli mnogo veći od broja uzoraka, PLS-DA model može da bude precenjen i da se dobiju neodgovarajuće klasifikacije. Shodno tome, PLS-DA algoritam može razdvojiti dve grupe sastavljene od potpuno slučajnih podataka. Dalje, ispitivani set se može podeliti na kalibracioni i test set u cilju provere modela [64, 65].

2.9.4. Linearna diskriminanta analiza, LDA

Linearna diskriminantna analiza je možda najčešće korišćena klasifikaciona metoda koja se zasniva na građenju linearno diskriminantnih funkcija, koje povećavaju razliku između uzoraka koji pripadaju različitim klasama, na račun smanjenja razlike između uzoraka koji pripadaju istoj klasi. Za razliku od PCA, koja ima ulogu redukcije multidimenzionalnog prostora, LDA određuje pravce u kojima je razlika između klasa maksimalna. Prema Fišer-u, broj diskriminantnih funkcija je jednak broju klasa minus jedan, u slučaju kada je broj promenljivih veći od broja klasa [66]. LDA kao kalibraciona tehnika se koristi u cilju identifikacije varijabli odgovornih za klasifikaciju uzoraka i konstrukciju modela za predviđanja klasifikacije novih uzoraka čija grupna pripadnost nije poznata [66]. U cilju validacije modela za predviđanje klasifikacije, LDA jednačine su izvedene kao linearna kombinacija originalnih varijabli:

$$D_j = B_{0j} + B_{1j}X_1 + \dots + B_{nj}X_n,$$

gde D_j predstavlja diskriminantne skorove ($j_u = 1, \dots, m-1$), m broj grupa, B_{0j} konstanta koja mora biti uvedena, iz razloga što eksperimentalne vrednosti nisu standardizovane tokom analize, B_{ij} i X_i ($i = 1, \dots, n$) su koeficijenti i vrednosti svake od nezavisnih varijabli prema LDA modelu. Koeficijenti linearno diskriminantne funkcije su izabrani tako da odnos suma kvadrata između grupa i suma kvadrata unutar grupa bude što veći. Na osnovu standardizovanih kanoničnih koeficijenata mogu se identifikovati varijable koje su najznačajnije za klasifikaciju objekata. Dalje, grafički prikaz projekcije skorova pokazuje klasifikaciju objekata [64, 66].

2.9.5. Priprema slike hromatograma za multivarijantnu analizu

Hromatogram dobijen tankoslojnom hromatografijom daje veliki broj informacija o ispitivanom analitu koje se odnose na hemijske i fizičke karakteristike ispitivanih jedinjenja. Pažljiv izbor sredstva za derivatizaciju omogućava markiranje određenih zona od svih prisutnih na hromatogramu [28].

Različiti uređaji se koriste za snimanje TLC hromatograma, kao što su kamera i DigiStope 2 uređaj. Glavna prednost kamera u odnosu na ostale je dostupnost i niska cena,

ali sa druge strane većina kamere ne poseduju sistem za lumiscenciju. Takođe, rastojanje od ploče do kamere nije fiksirano. Dvanaestobitna (Charged Coupled Devices, CCD) kamera koja ulazi u sastav DigiStore 2 uređaja obezbeđuje visokosofisticiranu dokumentaciju hromatograma. Ovaj uređaj je povezan sa *WinCat* softverom i jednostavan je za upravljanje [28].

Slike hromatograma za multivarijantnu obradu se obično koriste u obliku TIFF (eng. *Tagged Image File Format*, TIFF) formata, ili u obliku JPEG (eng. *Joint Photographic Experts Group*, JPEG) formata. TIFF format se najčešće koristi kao 8- ili 16-bitni po kanalu. Za razliku od TIFF-a, JPEG format je efikasniji, jer sadrži više informacija po bitu [28]. Nekoliko komercijalno dostupnih softvera se koristi za obradu slike hromatograma, kao što su ImageJ (ver.1.43q Wayne Rasband, National Institutes of Health, USA; <http://rsb.info.nih.gov/ij>), JustTLC (Sweeday, Lund, Sweden, <http://www.sweday.com/Products.Spx>) ili Sorbfil TLC Videodensitomer (Ivan Mihtarov, Sorbfil, Russia, <http://www.sorbfil.com/en/index.htm>, itd) [28]. ImageJ je elektronski dostupan softver. Analiza fotografije hromatograma pomoću ovog softvera obuhvata nekoliko koraka: označavanje zona na hromatogramu, isecanje selektovane površine, i rotiranje hromatograma za 90°. Kada su zone na hromatogramu različite boje, primenom odgovarajućih kanala kao što su crveni (red, **R**), zeleni (green, **G**) i plavi (blue, **B**) se može povećati selektivnost razdvajanja. Sa druge strane, ako su zone iste boje hromatogram se može prevesti u gray skalu [28].

Nakon toga, primenom odgovarajućih filtera povećava se rezolucija profila, odstranjuju šumovi sa HPTLC profila. Filteri koji se koriste su Savitzky-Gplay filter, Median filter, Adaptive Degree Polynomial filter, Fourier denosion i drugi [28].

Usled razlika u sastavu mobilne faze, temperature, vlažnosti, instrumentalne nestabilnosti i slučajnih grešaka dolazi do pomeranja zona ispitivanih uzoraka unutar jedne ili više ploča, te se iz tih razloga primenjuje korekcija položaja pikova u vidu procedure "savijanja". HPTLC hromatogrami poravnjati dodatkom ili oduzimanjem određenih segmenata u blizini odabranog pika, što rezultuje poravnanjem R_F vrednosti zone određenog fenola. Iz tih razloga se može primeniti procedura savijanja, kao što su dinamičko vreme savijanja (DTW) i korelacija optimizacije savijanja (COW) [67].

3. EKSPERIMENTALNI DEO

3.1. Reagensi

Sve standardne supstance i rastvarači korišćeni za eksperimentalni rad su analitičkog stepena čistoće. Toluen, *n*-heksan, dihlorometan, etil-acetat, metanol, mravlja kiselina i sirćetna kiselina su HPLC stepena čistoće (*Merck*, Darmstadt, Nemačka). Etanol 96% (v/v) korišćen za ekstrakciju sirovog propolisa je proizveden u *Zorki* (Šabac, Srbija).

Ultračista voda (*Thermofisher TKA MicroPure*) sistem za prečišćavanje vode, 0,055 $\mu\text{S}/\text{cm}$) korišćena je za pripremu standardnih rastvora, uzoraka i polaznih rastvora.

Standardi fenolnih jedinjenja: kvercetin, apigenin, kampferol, luteolin, krisin, pinocembrin, galangin, naringenin i rutin nabavljeni su od švajcarskog proizvođača *Fluka AG*. *p*-Kumarinska, kofeinska kiselina, 3-*O*-kofeoilkininska (hlorogenska), galna i protokatehinska kiselina nabavljeni su od firme *Sigma Aldrich* (Štajnajm, Nemačka).

2-Aminoetil difenilborinat (NTS) korišćen za derivatizaciju TLC ploča je proizvedena u *Fluka AG* (Štajnajm, Nemačka). Polietilen glikol (PEG 400) korišćen za pojačavanje intenziteta fluorescencije je proizveden od strane *Sigma Aldrich* (Štajnajm, Nemačka).

Neorganske soli kao što su kalijum-hlorid, natrijum-karbonat, natrijum-hlorid, magnezijum-sulfat korišćeni bez predhodnog prečišćavanja su analitičkog stepena čistoće (*Merck*, Nemačka). Folin-Ciocalteu reagens ($(\text{H}_3\text{PW}_{12}\text{O}_{40})$) i fosfomolibdenove kiseline ($(\text{H}_3\text{PMo}_{12}\text{O}_{40})$, (komercijalni proizvod)) kao i di(fenil)-(2,4,6-trinitrofenil) iminoazanijum, (DPPH) su kupljeni od firme *Sigma Aldrich* (Štajnajm, Nemačka). Filteri za prečišćavanje uzoraka (13 mm, PTFE membrane 0,45 μm) nabavljeni su od firme *Supelko* (*Belefonte, PA, SAD*).

3.2. Ekstrakcija

3.2.1. Ekstrakcija propolisa

Pedeset tri uzorka propolisa su prikupljena na teritoriji Srbije tokom 2010. i 2011. godine. Tri uzorka su poreklom iz Nemačke, Danske i Hrvatske. Karta Srbije sa mapom uzoraka propolisa je prikazana na Slici 11.



Slika 11. Lokacija mesta prikupljanja uzoraka propolisa.

Svi uzorci su prema geografskom poreklu podeljeni u sedam regiona: Vojvodina, Centralni region, Zapadni region, Istočni region, Južni region, Kosovo i Metohija, Beogradski region (Prilog, Tabela T1.). Približno 1 g propolisa je rastvoren u 10 ml 80% etanola (etanol : voda = 8 : 2 v/v). Nakon toga, smeša je refluktovana 2 h na 70 °C, a rastvor je zatim proceden. Talog je sušen na sobnoj temperaturi i nakon toga meren. Filtrat je proceden kroz filter hartiju, zatim uparen do suva i rastvoren u 5 ml metanola. Tako dobijeni rastvor se koristio za dalju analizu. Spisak uzoraka sa geografskim poreklom, procentom voska, klasifikaciji uzoraka prema tankoslojnoj hromatografiji je prikazana u Prilogu u Tabeli T1. Ekstrakti smola pupoljaka topole (*Populus nigra*) su dobijeni od Poljoprivrednog fakulteta, Univerziteta u Beogradu. Ekstrakti hrvatskog, slovenakog, francuskog i brazilskog propolisa su dobijeni od laboratorije za hemiju hrane, Nacionalnog instituta za hemiju, Ljubljana, Slovenija.

3.3. Visokoeфикасна tankoslojna hromatografija srpskog i nemačkog propolisa

Za hromatografska ispitivanja primenjena je tehnika horizontalne tankoslojne hromatografije. Hromatografski sistem korišćen za analizu 51 uzorka srpskog propolisa se sastojao od amino NH₂ HPTLC ploča (Art. 12372, Merck, Darmstadt, Germany) kao stacionarne i toluen : etil acetat : mravlja kiselina (6:5:1, v/v/v) kao mobilne faze.

Zapremina od 2 µl ekstrakata propolisa je naneta na ploče dimenzije (20 × 10 cm) u obliku traka dužine 8 mm koristeći TLC CAMAG Linomat 4 za automatsko nanošenje uzorka (CAMAG, Muttensz, Švajcarska). Relativna vlažnost je podešena na 75% rastvorom natrijum-hlorida u vremenskom intervalu od 10 min. Vreme sićenja kade parama rastvarača iznosilo je 20 min. Front rastvarača je 70 mm, a vreme sušenja nakon razvijanja hromatograma 5 min. Ploče su nakon razvijanja zagrevane 3 min na 100 °C primenom TLC Heater III (CAMAG) i odmah uronjene u 0,3% rastvor NTS (etanolamin difenilborat) u etil-acetatu u trajanju od 1 s, korišćenjem Chromatogram Immersion devices III (CAMAG.). Nakon 5 min sušenja na vazduhu, razvijene ploče su uronjene u 0,5% rastvor polietilenglikola 400 u dihlometanu za 1 s, za pojačavanje i stabilizaciju fluorescentnih zona. Dokumentovanje slika je izvedeno ispod 366 nm sa (CAMAG) video

dokumentacijom sistema u vezi sa Reprostar 3 (CAMAG). Fotografije su čuvane u TIF formatu za dalju obradu slike.

Za određivanje fenolnog profila nemačkog propolisa primenjena je tehnika horizontalne tankoslojne hromatografije. Ekstrakti nemačkog propolisa dobijeni od Državnog instituta za pčelarstvo (Stuttgart, Germany) naneti su na ploču silika gela 60, 20 × 10 cm. Širina zone je iznosila 8 mm. Hromatografsko razdvajanje je izvedeno u vertikalnoj kadi sa dva kanala 20 × 10 cm (CAMAG, Muttenz, Switzerland), primenom rastvarača *n*-heksan : etil acetat: sirćetna kiselina (5:3:1, v/v/v). Pređeni put rastvarača je iznosio 65 mm. Tokom razvijanja hromatograma, ploče su sićene 37% hlorovodoničnom kiselinom, sipanom u drugi kanal kade. Nakon razvijanja ploče su sušene 3 minuta na toplom vazduhu, a potom uronjenje u Neu-ov reagens koristeći chromatogram immersion device (CAMAG) i, nakon sušenja, ponovo uronjene u polietilen glikol. Snimanje slika je izvedeno na 366 nm sa Baumer Optronik DXA 232 digitalnom kamerom sa 12-bit po kanalu sa charge-coupled device (CCD).

3.3. 1. Prevođenje slike u matricu podataka za multivarijantnu analizu

Slike hromatograma su procesuirane primenom *ImageJ* softvera. Slika je otvorena preko opcije (**File/Open**) i nakon toga, ispitivani uzorci su označeni duž cele ploče, sa jedne strane i od startne mrlje do fronta rastvarača sa druge strane, primenom opcije (**Selection/Image/Crop**). Da bi se odstranio šum signala, primenjen je median filter (**Process/Filter/Median**) sa širinom od tri piksela, bez oduzimanja pozadine. Zatim su slike rotirane za 90⁰, u cilju dobijanja profila pojedinih zona uzoraka (**Image/Transform/Rotate 90 Degrees Right**). Crtanje profila propolisa (**Analyse/Plot Profile/Selected area 2.41 × 0.29**) se izvodi za svaki uzorak ponaosob, za svaki kanal posebno. Dobijeni profil predstavlja grafički prikaz zavisnosti intenziteta zona (izražen u pikselima) u funkciji rastojanja. Ovako dobijene vrednosti su transportovane u *Excel*, u cilju dalje multivarijantne analize.

Drugi način za prevođenje slike u matricu je razvijen prilikom analiziranja nemačkog propolisa. Ovaj postupak se zasniva na prevođenju slike hromatograma u gray skalu. Nakon toga, primenjena je operacija (*im2double*) u MATLAB softveru, u cilju

odstajanja nečistoća i zadržavanja osvetljenja slike. Na ovaj način je slika pretvorena u matricu podataka. Dobijena matrica podataka je prebačena u Microsoft Office Excel 2007 radi dobijanja pojedinačnog profila svakog ispitivanog uzorka i standardnih smeša pojedinih fenola računanjem srednjih vrednosti za svaku zonu ponaosob. Tako dobijene vrednosti su dalje korišćene za multivarijantnu analizu.

3.4. Masena spektrometrija

3.4.1. UHPLC-LTQ Orbitrap MS/MS primenjena u analizi propolisa

Polazni rastvor smeše flavonoida (luteolin, kvercetin, apigenin, kempferol, naringenin, krisin, pinocembrin i galangin) i fenolnih kiselina (kofeinska kiselina, *p*-kumarinska kiselina) koncentracije 1000 mg/l je pripremljen rastvaranjem standardnih jedinjenja u metanolu. Razblaživanjem polaznog rastvora metanolom pripremljena je serija radnih rastvora koncentracija: 0,025; 0,05; 0,10; 0,25; 0,50; 0,75 i 1,00 mg/l. Polazni i radni rastvori su čuvani u mraku na 4 °C. Kalibracione krive su dobijene korelisanjem površine pikova sa koncentracijom standardnih rastvora.

Sistem za ultraefikasnu tečnu hromatografiju (UPLC) sastojao se od Accela 600 pumpe i Accela autosemplera (Thermo Fisher Scientific). Kolona korišćena za analitičko razdvajanje je Hypersil gold C18 colona (50 × 2,1 mm, 1,9 µm veličina čestica) (Thermo Fisher Scientific). Mobilna faza je sastavljena od (A) vode sa 1% mravlje kiseline i (B) acetonitrila. Gradijentni program je bio: 0,0-10,0 min, 5-95% B; 10,0-12,0 min, 95% B; 12-12,2 min, 95-5% B; 12,2-15 min, 5% B. Injekciona zapremina za sve uzorke iznosi 5 µl, a brzina protoka je 300 µl/min.

Ultraefikasna tečna hromatografija je kuplovana sa linearnim jon trap-Orbitrap hibridnim masenim analizatorom (HESI-II, Thermo Fisher Scientific). Ionizacija je izvedena u negativnom modu. Vrednosti parametara jonskog izvora su iznosili: napon jonskog izvora 5 kV, napon kapilara -40 V, napon cevi -80 V, temperatura kapilare 275 °C, glavni i pomoćni protok gasa (N₂) 42 i 11 proizvodnih jedinica. Maseni spektar je sniman u opsegu odnosa *m/z* 100-900. Za studije fragmentacije podaci koji zavise od snimanja su

ostvoreni kolziona indukovana disocijacija (CID). Normalna kolziona energija (CID) indukovane disocijacije iznosila je 35 eV.

Fenolna jedinjenja su identifikovana i kvantifikovana prema masenim spektrima ispitivanih jedinjenja. Masa identifikovanih molekula dobijena na osnovu UHPLC-LTQ Orbitrap MS/MS je poređena sa tačnom masom izračunatom primenom ChemSpider softvera (www.chemspider.com) kao referentne biblioteke identifikovanih jedinjenja. Granica detekcije (GD) i granica kvantifikacije (GQ) su računate koristeći standardnu devijaciju odgovora (SD) i odsečak kalibracione krive (S) prema formuli: $LOD = 3(SD/S)$ i $GK = 10(SD/S)$. Povratni prinos (recovery) je određen na tri koncentraciona nivoa od 20 ppm, 50 ppm, 70 ppm za krisin, pinocembrin, galangin, koji se nalaze u visokoj koncentraciji u propolisu topola tipa i 10, 25 i 50 ppm za kafeinsku kiselinu, *p*-kumarinsku kiselinu, luteolin, kvercetin, apigenin, naringenin i kempferol, koji su prisutni u nižoj koncentraciji. U jedan gram propolisa je dodata gore navedena količina fenola u 10 ml rastvora (etanol/voda= 8 : 2, v/v). Ekstrakcija je izvedena po predhodno opisanoj proceduri.

3.4.2. Direktna analiza u realnom vremenu (*Direct analysis in Real Time, DART*)

primenjena u analizi propolisa

Direktna analiza u realnom vremenu je primenjena za ispitivanje fenolnog profila ekstrakata nemačkog propolisa. Jonski izvor DART-SVPA (IonSense, Saugus, MA, USA) je opremljen autosemplerom sa 12 pipeta (12 DIP-it[®]) koji omogućava analizu 12 uzoraka za veoma kratko vreme. Merač brzine protoka helijuma kroz jonski izvor omogućava kontrolu protoka gasa u opsegu brzina od 3,2 do 3,4 lmin. Temperatura snimanja je iznosila 150 °C i 300 °C primenjujući DART kontrolni softver (IonSense). Pomeranje nosača sa 12 pipeta duž izvora jonizacije je omogućeno ručno ili softverski brzinom od 0,2 do 10 mm/s. Napon snimanja je iznosio 4 kV, dok je napon elektroda 1 i 2 iznosio od 100 do 250 V, redom. Korišćeni helijum i azot su visokog stepena čistoće (99,999%). Jonski izvor je povezan preko isparivača sa G1956B MSD kvadrupol masenim analizatorom (Agilent, Waldbonn, Germany). Maseni spektri su snimani u negativnom jonizacionom obliku. Podaci su procesuirani u TH/MSD Chemstation B.02.01.-SR1 (260) u Agilent softveru. Ukupna jonska struja je snimana u opsegu od *m/z* 70-700.

3.5. Spektrofotometrijsko ispitivanje srpskog propolisa

Apsorpcioni spektri srpskog propolisa su snimani na UV-VIS spektrofotometru (GBC UV-Visible Cintra 6). Uzorci propolisa su razblaženi 100 puta (0,1 ml do 10 ml) etanolom. Spektri su snimani između 250 nm i 400 nm u uzastopnim koracima od 1,75 nm. Reproductivnost (za vrednosti apsorpcije i talasne dužine snimanja) je proveravana u najmanje dva puta za svaki uzorak.

3.5.1. Određivanje relativne antioksidativne aktivnosti srpskog propolisa DPPH

Odmereno je 0,0078 g DPPH i rastvoreno u 250 ml metanola. Nakon toga, merena je apsorbancija sveže spremljenog rastvora. Apsorbancija dobijenog rastvora je iznosila 0,826. Uzorci srpskog propolisa su razblaženi 100 puta (0,1 ml do 10 ml) etanolom. U epruvetu je dodato 0,1 ml EEP i 4,0 ml spremljenog rastvora DPPH. Nakon toga, epruvete su promućkane, odložene na tamno mesto i nakon 45 minuta mereno je smanjenje apsorbancije na 517 nm. Relativna antioksidativna aktivnost je izračunata po jednačini [68]:

$$\text{Relativna Antioksidativna aktivnost (\%)} = \frac{A_{DPPH} - A_{uzorka}}{A_{DPPH}} \cdot 100 \%$$

3.5.2. Određivanje sadržaja ukupnih fenola u propolisu

Ukupan sadržaj fenola u uzorcima srpskog propolisa je određen Folin-Ciocalteu metodom. Uzorci propolisa su razblaženi 100 puta (0,1 ml do 10 ml) etanolom. U 0,1 ml etanolnog ekstrakta propolisa (EEP) dodato je 6,0 ml vode, zatim 0,5 ml Folin–Ciocalteu reagensa. Po dodatku reagensa, rastvor je promućkan. Nakon toga, dodato je 1,5 ml 20% rastvora natrijum-karbonata. Rastvor je promešan i inkubiran pola sata na 40 °C. Nakon toga, merena je apsorbancija rastvora na 720 nm. Napravljena je serija standardnih rastvora galne kiseline: 100 ppm, 150 ppm, 200 ppm, 250 ppm, 300 ppm, 400 ppm, 500 ppm [68].

3.5.3. Određivanje sadržaja ukupnih flavonoida u srpskom propolisu

Ukupan sadržaj flavonoida je određen spektrofotometrijski kompleksiranjem aluminijum-hloridom. Alikvot od 0,4 ml EEP je razblažen vodom do 7,6 ml. Nakon toga u

kivetu je dodato 0,4 ml 10% rastvora aluminijum-hlorida. Uzorci propolisa su razblaženi 100 puta (0,1 ml do 10 ml) etanolom. Rastvor je inkubiran sat vremena na sobnoj temperaturi uz povremeno mešanje. Nakon toga, merena je apsorbancija na 420 nm. Napravljena je serija standardnih rastvora kvercetina sledećih koncentracija: 10 ppm, 20 ppm, 40 ppm, 60 ppm, 80 ppm, 100 ppm. Standardni rastvor (0,8 ml) je razblažen sa 6,4 ml metanola, nakon toga je dodato 0,8 ml 10% AlCl_3 [68].

3.6. Ciklična voltametrija u analizi fenolnih jedinjenja iz propolisa

Ciklični voltamogrami su snimljeni na aparatu za cikličnu voltametriju CHI760B (CH Instruments, Austin, Texas, USA). Čelija je opremljena elektrodom od staklastog ugljenika (Glass Carbon Electrode, GC) kao radnom, platinskom (Model CHI221) kao pomoćnom i Ag/AgCl kao referentnom elektrodom (Model CHI111). Sva merenja su izvedena na sobnoj temperaturi. Uzorci propolisa su razblaženi 100 puta (0,1 ml do 10 ml) etanolom. Ciklični voltamogrami su snimani u opsegu potencijala od -0,2 do 1V.

3.7. Indukovano kuplovana plazma u analizi elemenata u propolisu

3.7.1. Mikrotalasna digestija

Mikrotalasna digestija je izvedena u mikrotalasnoj peći (Maison, Italija) u politetrafluoroetilenskim sudovima, korišćenjem smeše koja se sastoji od 10 ml HNO_3 i 1 ml H_2O_2 i 0,5 g svakog uzorka. Temperaturni gradijent je iznosio od 20 °C do 200 °C u periodu od 20 minuta i onda je temperatura održavana konstantnom 15 minuta (sa maksimalnom snagom od 1230 W). Ohlađeni rastvori su prebačeni u normalne sudove zapremine 25 ml i nakon toga razblaženi do crte.

3.7.2. Analiza metala

Sadržaj sledećih elemenata: Al, B, Ba, Ca, Cd, Co, Cr, Cu, Fe, K, Li, Mg, Mn, Mo, Na, Ni, Pb, Si, Sr, Ti, V i Zn je određen koristeći induktivno spregnutu plazmu (iCAP-6500 Duo, Thermo Scientific, UK). Sistem je opremljen integrisanom jedinicom za hidridno određivanje. Koncentracija As i Hg je određena hidridnom tehnikom. Hidridi ovih

elemenata su generisani sa 0, 6% NaBH₄ (u 0, 5% NaOH) i 6 mol/l HCl. Polazni standardni rastvori su pripremljeni od rastvora koncentracije 1000 mg/L, osim As i Hg, gde je koncentracija rastvora bila 10 mg/l. Instrumentalna kalibracija je proveravana svakih 10-12 uzoraka.

3.8. Antimikrobna aktivnost propolisa

3.8.1. Materijal

U ovom radu korišćena je kolekcija Gram-pozitivnih i Gram-negativnih bakterijskih izolata iz postojeće laboratorijske ATCC kolekcije Katedre za mikrobiologiju Biološkog fakulteta Univerziteta u Beogradu:

Listeria monocytogenes ATCC19111, *Staphylococcus aureus* ATCC23023, *Bacillus subtilis* ATCC6633, *Enterococcus faecalis* ATCC29212, *Micrococcus luteus* ATCC7468, *Streptococcus equisimilis* ATCC12394, *Aeromonas hydrophila* ATCC 49140, *Enterobacter cloacae* ATCC 49141, *Escherichia coli* ATCC 25922, *Proteus mirabilis* ATCC 25933, *Pseudomonas aeruginosa* ATCC 15422, *Salmonella enteritidis* ATCC 13076 i *Shigella flexneri* ATCC 9199.

3.8.2. Medijumi za gajenje bakterija

LA – Luria agar (Difco):

Bakto tripton	10 g
Ekstrakt kvasca	5 g
NaCl	5 g
Agar	15 g
1M NaOH	3 ml
Destilovana voda	1000 ml

LB – Luria-Bertani (Difco):

Bakto tripton	10 g
Ekstrakt kvasca	5 g
NaCl	5 g
1M NaOH	5 ml
Destilovana voda	1000 ml

BHI - Brain-Heart Infusion broth (Biomedics):

BHI	37 g
Destilovana voda	1000 ml

BHI-agar:

BHI sa dodatkom 15 g agara na 1000 ml destilovane vode.

MHB – Mueller-Hinton broth (Himedia):

MHB	21 g
Destilovana voda	1000 ml

MHA- Mueller-Hinton agar:

MHB sa dodatkom 15 g agara na 1000 ml destilovane vode

Soft agar:

Agar	6 g
NaCl	5 g
Destilovana voda	1000 ml

3.8.3. Antibiotici i reagensi korišćeni u MIC testu:

- Rifampicin, polazni rastvor koncentracije 100 mg/ml rastvaran u metanolu, koncentracija finalnog rastvora je iznosila 400 µg/ml,
- Ampicilin, polazni rastvor koncentracije 25 mg/ml rastvaran u metanolu, finalni rastvor je bio koncentracije 400 µg/ml,
- Streptomicin, polazni rastvor koncentracije 20 mg/ml rastvaran u metanolu, finalni rastvor je bio 400 µg/ml,
- Natrijum resazurin (>90 % (LC) $C_{12}H_6NaO_4 = 251,17$) 0,675 mg/ml finalne koncentracije.

3.8.4. Pripremanje prekonoćnih kultura bakterija

Sojevi *B. subtilis* i *E. faecalis* su gajeni u LB medijumu, *S. equisimilis*, *S. aureus* i *M. luteus* u MHB medijumu, a *L. monocytogenes* u BHI medijumu, 24 h na temperaturi od 37 °C.

Epruvete sa prekonoćnim kulturama bakterijskih sojeva su promućkane, zatim je spektrofotometrom (UV-630 pc Double Beam Spectrophotometer, MRC) izmerena optička gustina na 600 nm talasne dužine. Nakon očitavanja optičke gustine izvršeno je centrifugiranje na 4000 obrtaja/min u toku 10 minuta, nakon čega je odliven filtrat, a talog

je resuspendovan u sveže pripremljenom $0,01 \text{ mol/dm}^3 \text{ MgSO}_4$. Nakon resuspendovanja dobijen je željeni broj bakterija, tj. 10^8 prema Mc Farland-ovom standardu 0,5.

3.8.5. *Disk difuzioni test*

Za određivanje rezistencijebakterija prema različitim antimikrobnim agensima korišćena je metoda antibiogram postupka sa diskovima od filter-papira (Abtek, Engleska), tzv. “disc – diffusion” test. Princip ove metode zasniva se na tome da antimikrobni agens difunduje u podlogu i radijalno se širi, pri čemu njegova koncentracija opada sa udaljavanjem od ivice filter-papira. Ukoliko je bakterija osetljiva na delovanje testiranog antimikrobnog agensa, ona neće porasti u zoni njegovog delovanja. Stoga se, nakon inkubacije, oko filter-papira uočavaju zone odsustva rasta, tzv. zone inhibicije.

U Petri-šolje sa hranljivom podlogom razliveno je 5 ml rastopljenog soft-agara sa 50 μl prekončne kulture odgovarajućeg bakterijskog soja (1×10^8 bakterija/ml). Diskovi filter-papira natapani su sa po 10 μl odgovarajućeg uzorka propolisa. Impregnisan diskovi su zatim ravnomerno raspoređeni na površinu zasejane podloge pomoću sterilne pincete. U svaku Petri-šolju postavljen je po jedan filter-papir disk impregnisan sa 10 μl metanola, koji predstavlja kontrolu rastvarača. Svaka testirana bakterija izložena je gradijentu koncentracija od 200 mg/ml do 1,56 mg/ml, po principu svaka naredna koncentracija dvostruko manja od predhodne. Petri-šoljesu inkubirane u termostatu 24 h, na 37 °C. Nakon inkubacije, na podlozi se formirao gust bakterijski tepih na kojem se oko filter-papira uočava zona odsustva rasta, tzv. zona inhibicije. Milimetarskim lenjirom su izmerene zone ihibicije rasta, na osnovu kojih je utvrđena osetljivost bakterijskog soja na ispitivani propolis.

3.8.6. *Određivanje minimalne inhibitorne koncentracije (MIC)*

Minimalne inhibitorne i baktericidne koncentracije propolisa određivane su mikrodilucionom metodom u mikrotitracionim pločama, serijskim razblaživanjem ispitivanih uzoraka. Korišćene mikrotitracione ploče sadrže 96 bunarića raspoređenih u 12 kolona i 8 redova. U mikrotitracionoj ploči, za svaku testiranu bakteriju, pored kolona sa ispitivanim supstancama postoji i negativna kontrola (kontrola rasta bakterija) kao i „blank“

(kontrola sterilnosti medijuma). Kao pozitivna kontrola korišćeni su antibiotici: ampicilin, rifampicin i streptomycin. Takođe, pošto su uzorci propolisa rastvoreni u metanolu, rađena je i kontrola rastvarača za svaku bakteriju. Svi uzorci propolisa, kontrola rastvarača za svaku bakteriju, kao i antibiotska kontrola rađeni su u duplikatu. Kao indikator bakterijskog rasta korišćen je vodeni rastvor resazurina. Mikrotitarske ploče su punjene na sledeći način:

- Negativna (bakterijska) kontrola: u dva bunarića je dodato po 180 μ l odgovarajuće podloge (MHB, LB, BHI) i 20 μ l bakterija.
- Kolona sa ispitivanom supstancom: napravljen je gradijent tako što je u prvi bunarić dodato 160 μ l odgovarajuće podloge i 40 μ l supstance, a u ostale bunariće obeležene od B-G po 100 μ l. Zatim je iz prvog bunarića uzeto 100 μ l i prebačeno u drugi, iz drugog u treći i tako do poslednjeg iz kojeg je izbačeno 100 μ l rastvora. Posle napravljenog gradijenta, u svaki bunarić je dodato još po 80 μ l podloge i 20 μ l bakterija, tako da je finalna maksimalna koncentracija testiranih propolisa u prvim bunarićima bila 20 mg/ml.
- Pozitivna (antibiotska) kontrola: napravljen je gradijent tako što je u prvi bunarić dodato 200 μ l antibiotika koncentracije 400 μ g/ml, a u ostale bunariće po 100 μ l određene podloge. Zatim je iz prvog bunarića uzeto 100 μ l i prebačeno u drugi, iz drugog u treći i tako do poslednjeg iz kojeg je izbačeno 100 μ l rastvora. Posle napravljenog gradijenta, u svaki bunarić je dodato još po 80 μ l podloge i 20 μ l bakterija.
- Blank (kontrola sterilnosti medijuma): u bunariće je dodato po 200 μ l hranljive podloge.
- Kontrola rastvarača (metanol): napravljen je gradijen tako što je u prvi bunarić dodato 160 μ l hranljive podloge i 40 μ l rastvarača (onoliko koliko je bilo i testirane supstance), a u ostale bunariće obeležene od B-G po 100 μ l. Nakon toga, u svaki bunarić je dodato još po 80 μ l podloge i 20 μ l bakterija, tako da je finalna koncentracija rastvarača u prvim bunarićima bila 10%.

Očitavanje optičke gustine vršeno je u "Microplate reader"-u (Thermo Fisher Scientific Instruments Co., Sangay). Kako "Reader" čitač nema mogućnost oduzimanje slepe probe, urađena je i kolona za oduzimanje slepe probe testiranih propolisa, tako što je u prvi bunarić dodato 160 μ l hranljive podloge i 40 μ l propolisa, a u ostale po 100 μ l podloge. Napravljen je gradijent na isti način kako je prethodno navedeno, nakon čega je dodato još 100 μ l podloge.

Po završetku dodavanja svih potrebnih supstanci, mikrotitarske ploče su uvijene parafilmom i inkubirane 24 h na temperaturi od 37 °C. Nakon inkubacije i odmeravanja O.D. na 600 nm, dodato je 22 µl resazurina i ostavljeno na doinkubaciju u trajanju od 3 h. Resazurinska reakcija se prati promenom boje indikatora iz plave u ružičastu. Poslednja koncentracija pri kojoj nije došlo do promene boje tumači se kao MIC. Iz tog bunarića, sterilnom ezom uzeti su uzorci i zasejani na površinu čvrste MHA podloge. Nakon inkubacije od 24 h na 37 °C, posmatrana je pojava rasta bakterija u Petri-šoljama. Ukoliko je došlo do rasta, to je potvrda da je koncentracija propolisa u bunariću iz kojeg su zasejane bakterije minimalna inhibitorna koncentracija.

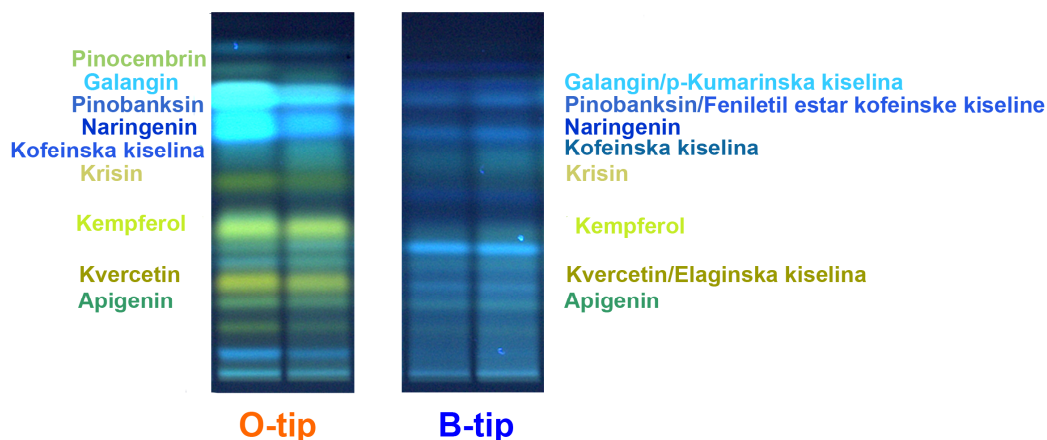
3.9. Multivarijantne metode

Multiarijantne metode kao što su PCA, HCA, PLS, PLS-DA izvedene su korišćenjem PLS Toolbox statističkog paketa (Eigenvectors Inc.v.7.0.5) u okviru MATLAB verzije 7.12.0 (R2011a) (MathWorks INC, Natick, MA, USA). Toplotna mapa je izvedena primenom elektronski dostupnog softvera GenEx® (MultiD Analysis, Göteborg, Sweden) (<http://genex.gene-quantification.info>). LDA je izvršena primenom SPSS 20.0 Statistics softvera (SPSS Inc., 2012).

4. NAŠI RADOVI

4.1. Fenolni profil srpskog propolisa određen visokoefikasnom tankoslojnom hromatografijom

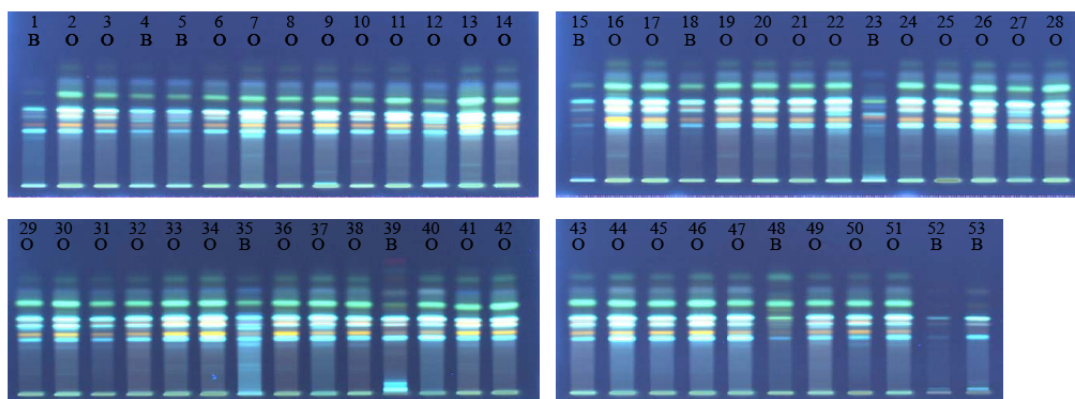
Visokoefikasna tankoslojna hromatografija je primenjena u cilju ispitivanja fenolnog profila ekstrakata srpskog propolisa. Na osnovu vizuelnog posmatranja dobijenih hromatograma mogu se razlikovati dva tipa srpskog propolisa. Uzorci koji sadrže oranž, žute i zelene zone su klasifikovani kao uzorci propolisa oranž tipa, dok uzorci su koji sadrže plave i zelene zone klasifikovani kao uzorci plavog tipa propolisa. Fenolni profili oranž i plavog tipa propolisa sa identifikovanim fenolnim jedinjenjima su prikazani na Slici 12. Ne može se jasno definisati razlika u fenolnom profilu ova dva tipa propolisa, obzirom da oranž tip sadrži plave zone, i obrnuto. Ovo bi se moglo objasniti na dva načina: *i*) raznolikim sastavom biljnih smola i *ii*) naknadnim mešanjem ova dva tipa propolisa.



Slika 12. Fenolni profil O (oranž) i B (plavog) tipa propolisa dobijen visokoefikasnom tankoslojnom hromatografijom.

Na osnovu fenolnog profila srpskog propolisa dobijenog HPTLC metodom (Slika 13) nameće se zaključak da je oranž tip propolisa dominantniji od plavog, što je moguće objasniti većom rasprostranjenošću glavnog botaničkog izvora oranž tipa propolisa. Uzorci koji pripadaju oranž tipu propolisa pokazuju skoro identičan fenolni profil, za razliku od

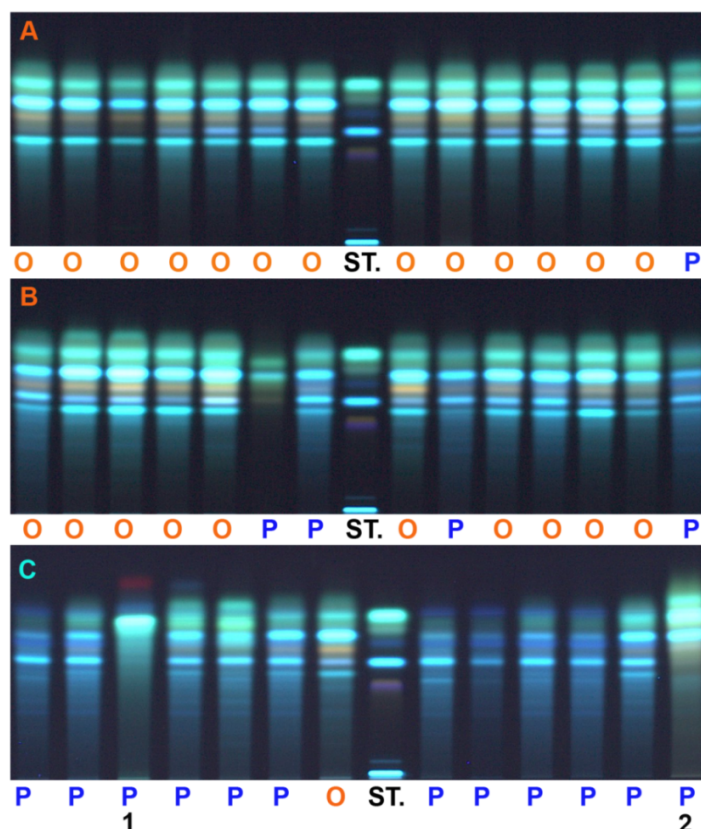
plavog tipa propolisa koji ima raznolik fenolni profil. Medonosne pčele najverovatnije prikupljaju smolu sa pupoljaka topole kao dominantnog biljnog izvora i proizvode oranž tip propolisa, dok plavi tip srpskog propolisa bi mogao biti smeša nekoliko biljnih vrsta (četinari, voće, breza, vrba, jasen) [2, 5].



Slika 13. Fenolni profil srpskog propolisa dobijen HPTLC metodom: O-oranž tip propolisa, B-plavi tip propolisa.

Fenolna jedinjenja karakteristična za oranž tip propolisa su kempferol, kvercetin, krisin i CAPE. Odabrana standardna fenolna jedinjenja hromatografisana sa uzorkom koji pripada oranž tipu propolisa su prikazana u Prilogu na Slici P1. Pored navedenog, uzorci koji su klasifikovani kao oranž tip sadrže i kofeinsku kiselinu i pinobanksin u većoj količini u odnosu na uzorke koji pripadaju plavom tipu propolisa. Jedinjenja koja karakterišu plavi tip srpskog propolisa su galangin, pinocembrin i fenolne kiseline [65]. U cilju boljeg razumevanja hemijskog sastava i botaničkog porekla srpskog propolisa nameće se potreba za njegovim poređenjem sa propolisima iz različitih regiona u okruženju. Fenolni profili slovenačkog, hrvatskog, srpskog kao i po jedan uzorak brazilskog (1) i francuskog (2) propolisa su dobijeni primenom HPTLC metode gde je korišćen silika-gela kao stacionarna faza (Slika 14). Na osnovu dobijenih hromatograma može se uočiti sličnost u fenolnom profilu ispitivanih uzoraka, osim u slučaju uzorka brazilskog propolisa. Slično kao i kod srpskog, u fenolnom profilu hrvatskog propolisa izdvajaju se dva tipa, oranž (dominantniji tip) i plavi. Među uzorcima slovenačkog propolisa dominira plavi tip (od 11 ispitivanih

uzoraka samo jedan uzorak pripada oranž tipu propolisa). Na Slici 14 (C) (oznaka 2) prikazan je fenolni profil uzorka koji potiče iz Francuske i očigledno je da on pripada plavom tipu.



Slika 14. Fenolni profil A) srpskog, B) hrvatskog i C) slovenačkog, C1 brazilskog i C2 francuskog, propolisa dobijen na osnovu HPTLC analize. P - oznaka za plavi propolis, O - oznaka za oranž propolis, ST. - smeša standardnih supstanci.

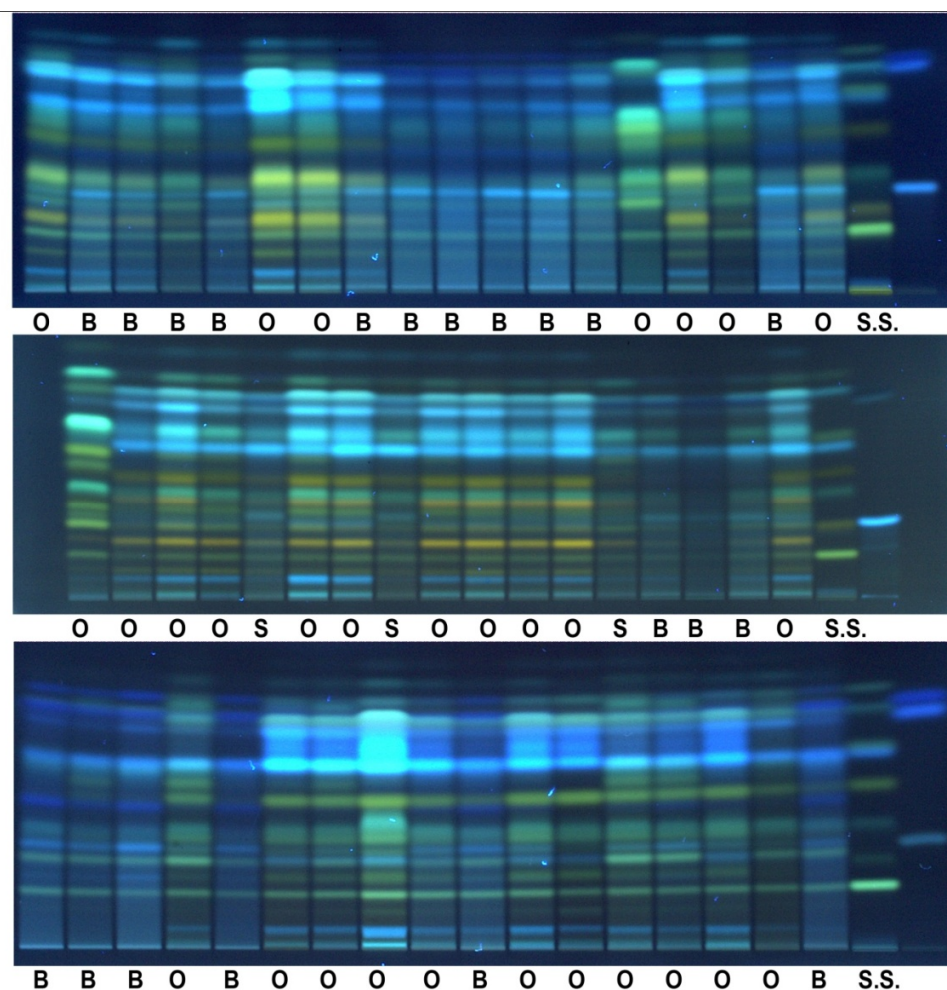
Uzorci slovenačkog propolisa koji pripadaju plavom tipu propolisa pokazuju raznovrstan fenolni profil i ovo nedvosmisleno ukazuje da pčele koriste nekoliko različitih biljnih izvora, slično kao i kod srpskog propolisa. Na osnovu Slike 12 i Slike P1 u Prilogu, može se zaključiti da plave zone potiču od fenolnih kiselina i galangina, pinocembrina i CAPE.

Fenolni profil rumunskog propolisa su ispitivali Sârby i saradnici takođe primenom tankoslojne hromatografije u kombinaciji sa hijerarhijskom klusterskom analizom [69].

Dobijeni hromatogrami jasno pokazuju postojanje dva tipa propolisa, koje su autori označili kao livadski i šumski tip. Propolisi koji sadrže oranž zone pripadaju tzv. livadskom tipu propolisa i u okviru ove grupe moguće je uočiti tri podgrupe, dok propolisi koji sadrže plave zone pripadaju tzv. šumskom tipu propolisa i u okviru ove grupe moguće je uočiti dve podgrupe. Ovakva klasifikacija rumunskog propolisa je potvrđena i hijerarhijskom klusterskom analizom koja jasno izdvaja dva klastera uzoraka različitog botaničkog porekla [69].

Medić-Šarić i saradnici su ispitivali ekstrakte hrvatskog propolisa korišćenjem TLC metode uz derivatizaciju fenolnih zona rastvorom aluminijum-hlorida. Od sedam ispitivanih uzoraka jedan uzorak (iz regiona Veliki Zdenci) se po svom fenolnom profilu izdvaja od ostalih. Rezultati do kojih su došli hrvatski istraživači nedvosmisleno potvrđuju postojanje dva tipa propolisa [70].

Morlock i Bertrams su, nezavisno jedno od drugog, ispitivali fenolni profil i botaničko poreklo nemačkog propolisa primenom HPTLC i TLC-MS metoda. Rezultati do kojih su došli nedvosmisleno potvrđuju prisustvo oranž i plavog tipa propolisa (Slika 15). Autori su ustanovili da oranž propolis potiče od biljnih vrsta kao što su *Populus canadensis* and *P. nigra* 'Italica'. Takođe, vrste topole kao što su *P. berolinensis*, *P. maximowiczii*, i *P. balsamifera*, predstavljaju botaničke izvore oranž tipa propolisa. Plavi tip nemačkog propolisa potiče od vrste topole *P. tremula*. U Tabeli 4 su prikazana jedinjenja karakteristična za oba tipa nemačkog propolisa i smole pupoljaka botaničkih izvora nemačkog propolisa [71, 72].



Slika 15. Fenolni profil nemačkog propolisa dobijen visokoefikasnom tankoslojnom hromatografijom. O - oranž tip, B - plavi tip propolisa, S.S. – standardne supstance.

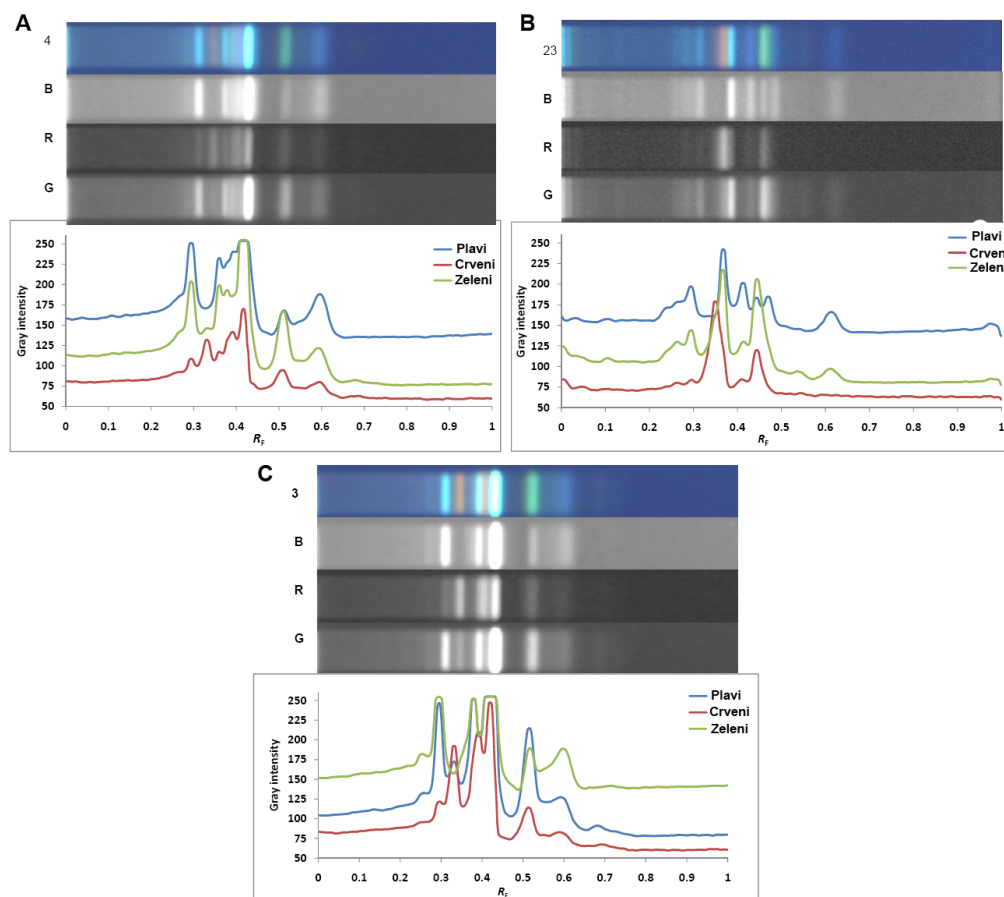
Scholl i Morlock su poredili fenolni profil nemačkog propolisa sa propolisima iz evropskih zemalja kao što su Rumunija, Španija, Bugarska i Italija. Ustanovili su da ovi propolisi pokazuju sličan fenolni profil kao i nemački propolis [71].

Tabela 4. Lista jedinjenja karakterističnih za P (plavi) i oranž (O) tip nemačkog propolisa [71, 72]

Zona	Jedinjenje	Boja zone	UV max [nm]	Biljni izvori propolisa	Tip propolisa
1	Elaginska kiselina	Plava	233, 367	<i>Poplar nigra</i>	P i O
2	Hlorogena kiselina	Plava		<i>Aesculus hippocastanum</i>	P i O
3	Apigenin	Zelena	268, 336	<i>Poplar nigra</i>	P i O
4	Kvercetin	Oranž	294, 366	<i>Poplar nigra</i>	P i O
3	Krisin	Oranž	270, 324	<i>Populus Canadensis</i>	P i O
6	Kofeinska kiselina	Svetloplava	274	<i>Populus canadensis</i>	P i O
7	Naringenin	Zelena	288	<i>Poplar nigra</i> , <i>Aesculus hippocastanum</i>	P i O
8	Kempferol	Zelena	268, 294, 368	<i>Poplar nigra</i> , <i>Aesculus hippocastanum</i>	P i O
9	CAPE	Svetloplava	296, 324	<i>Poplar nigra</i>	P i O
10	Galangin	Svetloplava	268, 292, 336	<i>Poplar nigra</i>	O
11	Pinocembrin	Zelena	288	<i>Poplar nigra</i>	O
12	Krisin-metiletar	Plava	288, 330	<i>Poplar nigra</i>	O
13	Kvercetin-metil-etar	Narandžasta	288, 338	<i>Populus xcanadensis</i>	O
14	Kempferol-metil-etar	Narandžasta	288, 338	<i>Populus canadensis</i>	O
13	Pinobanksin-metil-etar	Plava	288	<i>Populus canadensis</i>	O
16	Luteolin metal-etar	Žuta	290, 344	<i>Populus canadensis</i>	O
17	Kvercetin dimetil-etar	Žuta	290, 344	<i>Populus canadensis</i>	O
18	Benzil-estar kofeinske kiseline	Svetloplava	238, 298	<i>Populus canadensis</i>	O
19	Cinamoil-estar kofeinske kiseline	Svetloplava	238, 298	<i>Populus canadensis</i>	O
20	Pinobanksin acetat	Svetloplava	294, 318	<i>Populus canadensis</i>	O
21	Pinocembrin	Tamnozeleno	290	<i>Populus Canadensis</i> , <i>Aesculus hippocastanum</i>	O
22	Pinobanksin butirat	Tamnozeleno	290	<i>Populus canadensis</i>	O
23	Metilbutioil pinobanksin	Tamnozeleno	290	<i>Populus canadensis</i>	O
24	Dikofeoilacetilglicerol	Plavozelena	292, 318	<i>P. tremula</i>	P
23	<i>P</i> -kumaroilkofoilacetilglicerol	Plavozelena	320	<i>P. tremula</i>	P
26	Kofeoilferuoilacetilglicerol	Tamnoplava	320	<i>P. tremula</i>	P
27	di- <i>p</i> -kumaroilacetilglicerol	Tamnoplava	318	<i>P. tremula</i>	P

4.1.1. Fenolni profil srpskog propolisa na osnovu profila dobijenog ispitivanjem slike HPTLC hromatograma

Hromatogram predstavlja bogat izvor informacija o analitima. Na osnovu vizuelnog posmatranja HPTLC hromatograma, mogu se dobiti informacije o sličnosti odnosno razlikama između uzoraka, te količini fenolnih jedinjenja.

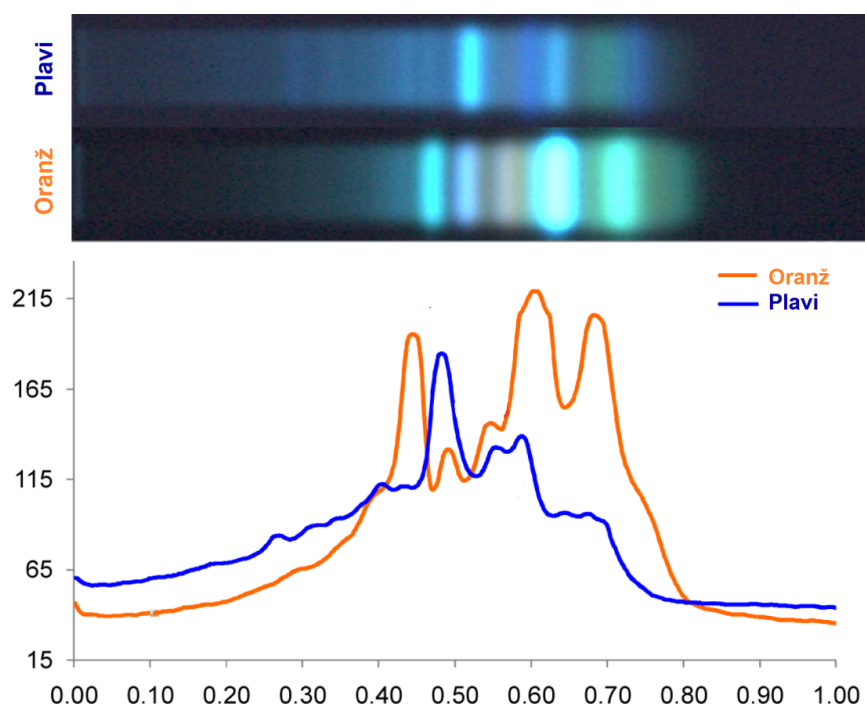


Slika 16. Fenolni profili plavog a, b) i oranž c) tipa sprskog propolisa dobijenom prema HPTLC studiji i ImageJ softveru.

Zbog razlike u hemijskoj strukturi, fenoli koji ulaze u sastav propolisa nakon derivatizacije daju zone različitih boja, te je slika hromatograma podeljena na tri kanala: crveni (red, **R**), zeleni (green, **G**) i plavi (blue, **B**). Fenolni profili oranž i plavog tipa propolisa dobijeni HPTLC metodom za sva tri kanala su prikazani na Slici 16. U slučaju

oranž tipa propolisa skoro identičan profil je dobijen za sva tri kanala, dok kod plavog tipa propolisa postoje značajne razlike. Na osnovu Slike 16, može se uočiti da crveni i plavi kanali kod oranž tipa propolisa pokazuju intenzivne pikove koji odgovaraju fenolima prisutnim u većoj količini, dok zeleni kanal daje pikove znatno manjeg intenziteta. Svi uzorci sadrže jednu zelenu zonu, koja je manjeg ili većeg intenziteta i u zelenom kanalu je prikazana u obliku intenzivnog pika [65].

Zeleni kanal je najznačajniji za razlikovanje plavog od oranž tipa propolisa jer izdvaja zelene i plavo-zelene zone prisutne u plavom tipu propolisa, dok su ostala dva kanala bitna za karakterizaciju oranž tipa propolisa [65].



Slika 17. Fenolni profili slovenačkog oranž (orange) i plavog (blue) tipa propolisa dobijenom prema HPTLC studiji i ImageJ softveru.

Na osnovu Slike 17 se može uočiti da plavi tip slovenačkog propolisa ima pikove manjeg intenziteta od oranž tipa. Uzorak koji pripada oranž tipu propolisa sadrži pikove koji potiču od plavih zona velikog intenziteta za razliku od plavog koji pokazuje jedan

intenzivni pik na $R_F = 0,50$. Može se uočiti razlika u fenolnom profilu između slovenačkog i srpskog propolisa koji pripada plavom tipu, jer plavi tip slovenačkog propolisa ne sadrži oranž zone.

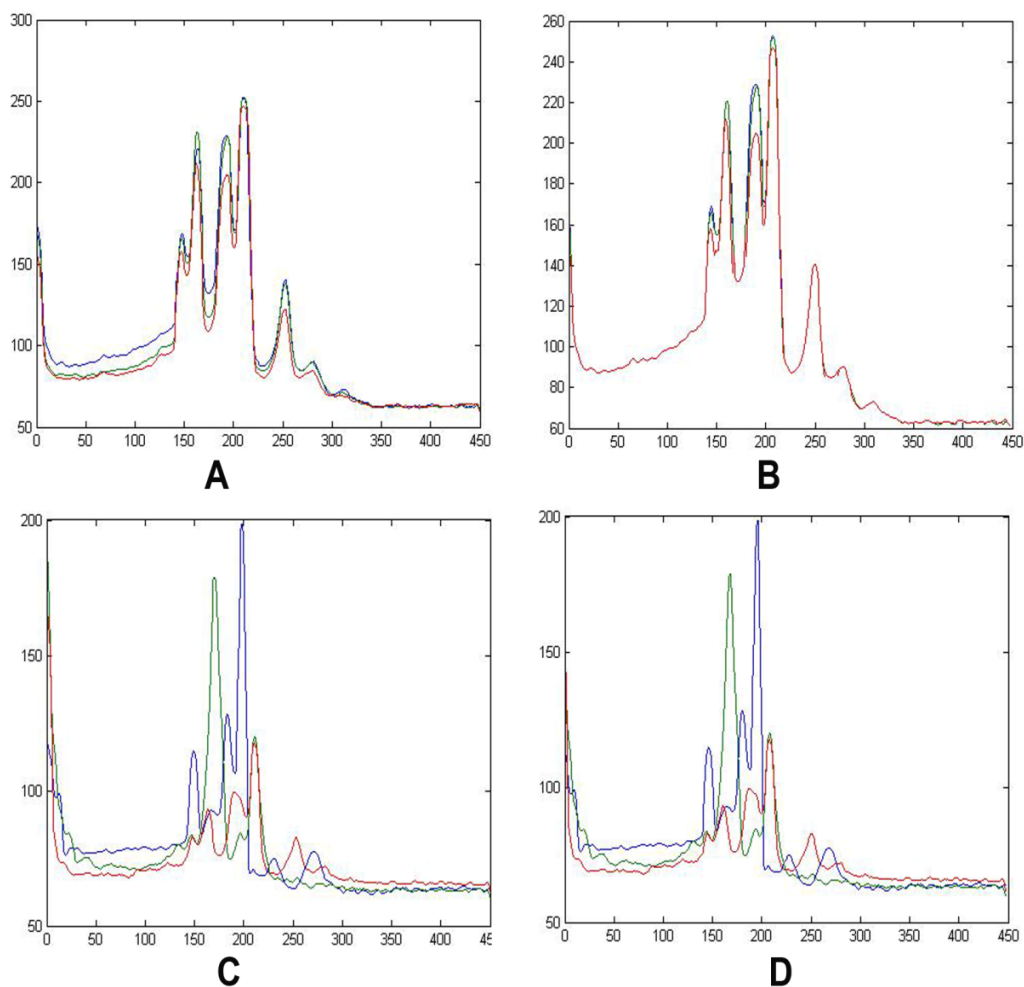
4.1.2. Multivarijantna analiza slike hromatograma srpskog propolisa

Kako bi se potvrdilo prisustvo dva tipa propolisa dobijenog HPTLC metodom primenjen je su PCA i HCA. Obzirom na postojanje zona različitih boja na hromatogramu, multivarijantne metode analize su primenjene za sva tri kanala, u cilju identifikacije kanala koji najbolje ukazuje na razlikovanje uzoraka koji pripadaju plavom i oranž tipu propolisa.

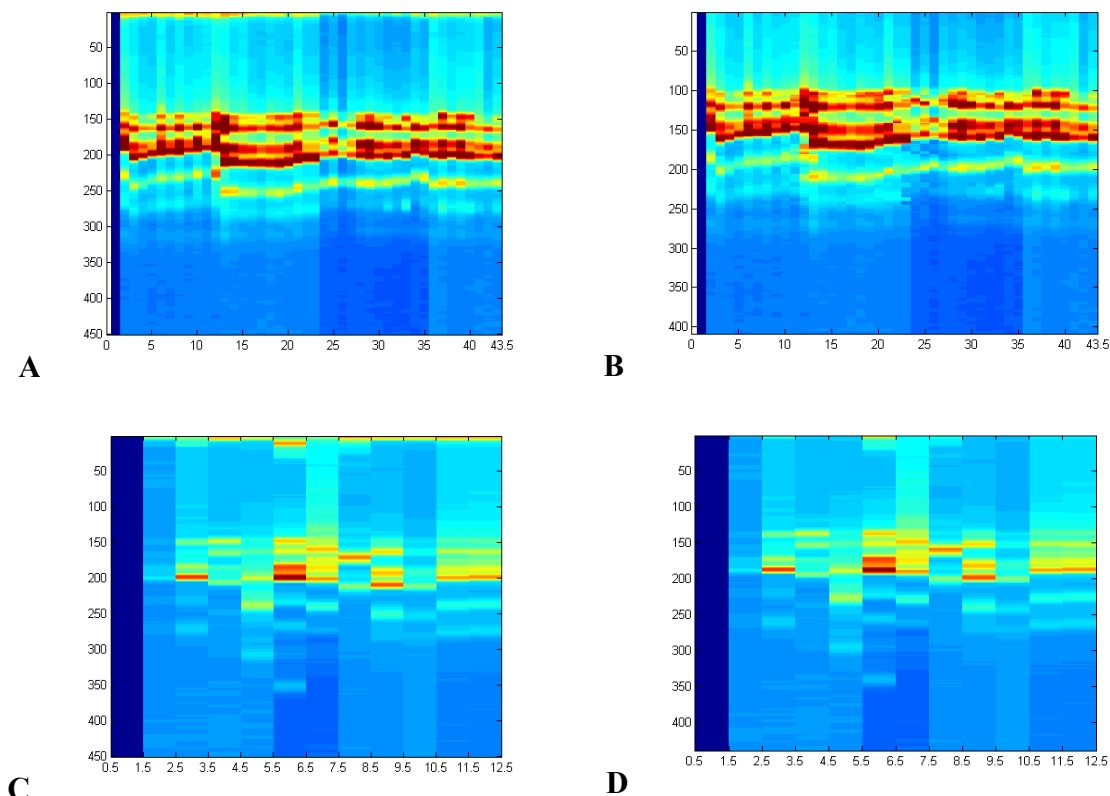
Varijable su predstavljene kao intenziteti razdvojenih zona (izražene u pikselima) duž puta hromatograma, počev od polazne mrlje do fronta rastavača, za svaki uzorak ponaosob. Srednje centriranje je primenjeno kao neophodan korak u cilju svođenja varijabli na jednaku težinu. Klasifikacione metode su primenjene na matricu podataka (33×430) pre i nakon korišćenja procedure savijanja (33×408) za svaki od tri kanala ponaosob.

S obzirom na postojanje dva tipa propolisa koji se razlikuju po fenolnom sastavu, nije moguće primeniti proceduru savijanja na sve uzorke, jer nisu isti fenoli prisutni u oba tipa propolisa, te se ne mogu preklapati. Uzorak **19** je izabran kao referentni za oranž tip, jer su fenolne zone ovog uzorka jasno razdvojene i definisane. Na Slici 18 (A, B) su prikazana tri reprezentivna uzorka koja pripadaju oranž tipu propolisa (**19**, **20**, **21**) pre i nakon procedure savijanja. Na osnovu prikazane slike može se uočiti neslaganje između fenolnih profila tri uzorka, pri čemu uzorak **21** odstupa od druga dva uzorka [65].

Uzorak broj **1** je izabran kao referentni uzorak za plavi tip pod istim kriterijumima kao i kod oranž tipa propolisa. Tako dobijeni profili, pre i nakon primene procedure savijanja, su podvrgnuti multivarijantnim hemometrijskim metodama. Slika 19 pokazuje profile plavog i oranž propolisa pre i nakon ove procedure. Uzorci koji pripadaju plavom propolisu (**1**, **2**, **4**) nakon primenjene procedure daju različit fenolni profil, jer postoji raznolikost u hemijskom sastavu između uzoraka. Sa druge strane, uzorci koji pripadaju oranž tipu pokazuju poravnanje između zona [65].



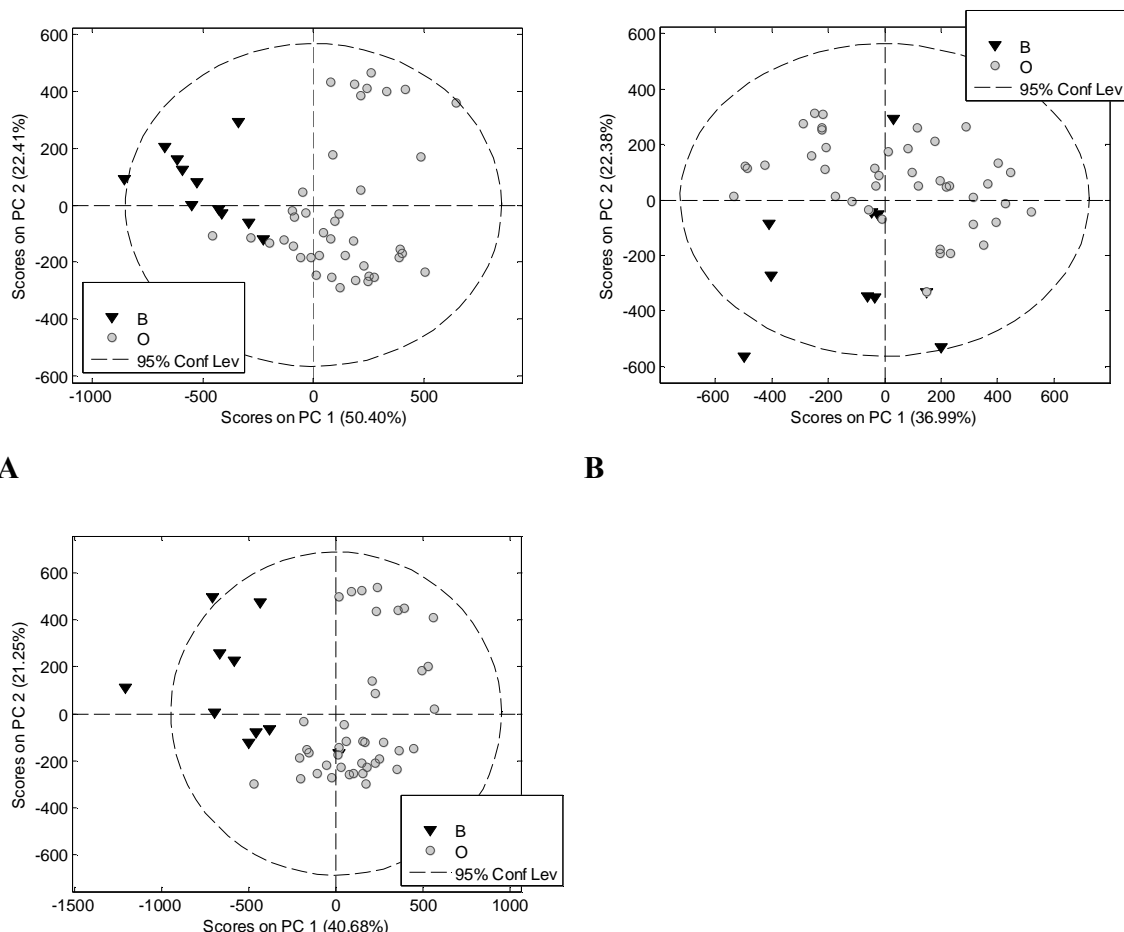
Slika 18. Fenolni profil: A) pre primene procedure savijanja, B) nakon primene procedure savijanja na uzorke (19, 20, 21) koji pripadaju oranž tipu propolisa, C) pre primene procedure savijanja, D) nakon primene procedure savijanja uzorke koji pripadaju (1, 2, 4) plavom tipu propolisa



Slika 19. Fenolni profili oranž (A, B) i plavog (C, D) propolisa pre i nakon primene procedure savijanja u dinamičnom vremenu (dynamic time warping, DTW), redom.

PCA je primenjena kako bi se podaci vizualizovali i smanjila dimenzionalnost multivarijantnog problema na svega dve ili tri dimezije (komponente). Na osnovu grafika skorova (Slika 20) prve dve komponente može se utvrditi raspored, odnosno grupisanje i eventualno prisustvo spoljašnjih uzoraka propolisa za sva tri kanala ponaosob. Statistički parametri PCA modela kao što su broj glavnih komponentata (PCs) i procenat ukupne varijabilnosti ispitivanih modela su prikazani u Tabeli 5. Vrednosti skorova, odnosno njihova uzajamna projekcija, za prve dve komponente pokazuju grupisanje uzoraka u dve grupe, što odgovara dobijenim HPTLC profilima. Uzorci koji su klasifikovani kao plavi tip propolisa su uglavnom raspoređeni sa leve strane grafika, dok se uzorci oranž propolisa

prostiru sa druge strane duž $PC1$. Duž $PC2$ se na grafiku skorova uočavaju dve podgrupe oranž propolisa. Neki uzorci se ne odvajaju jasno od ostalih, što se može objasniti blagom dominacijom fenola karakterističnih za oranž tip propolisa. Za razliku od PCA modela crvenog i zelenog kanala, plavi kanal ne pokazuje dobro razdvajanje [65].



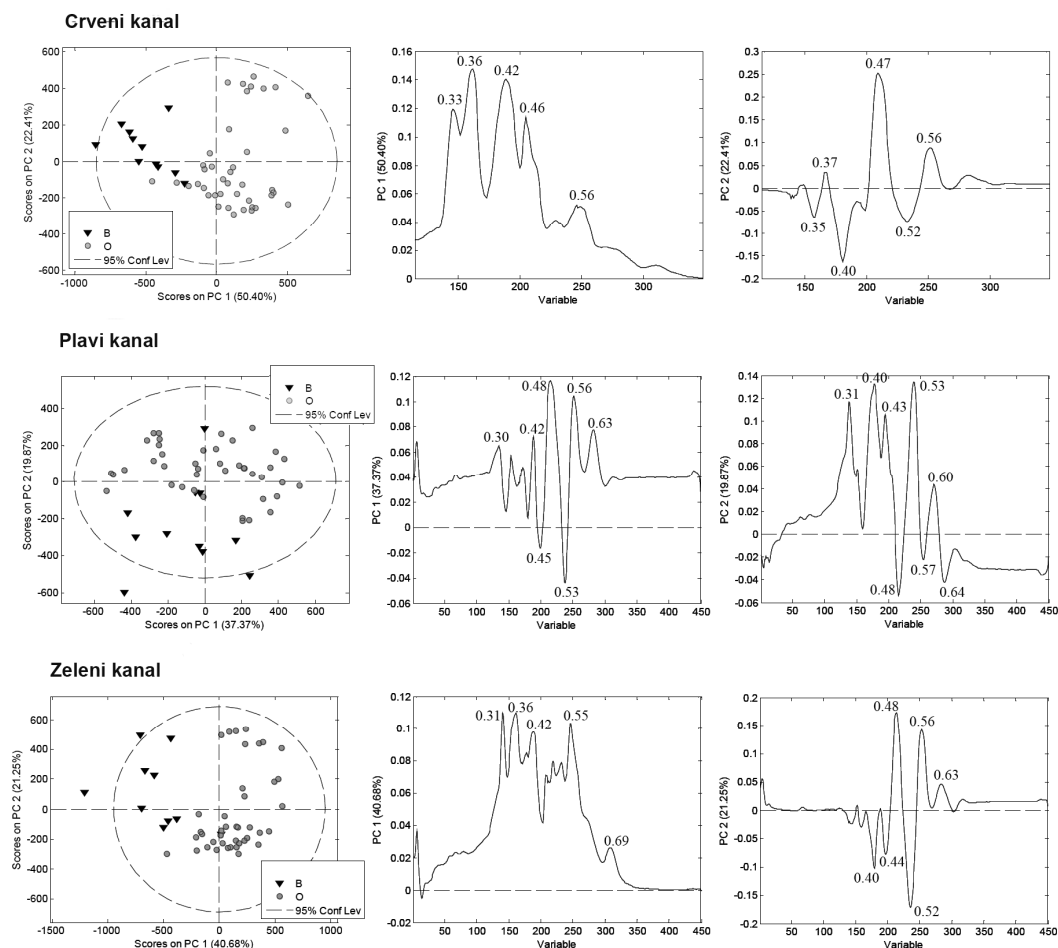
Slika 20. PCA grafici skorova dobijeni na osnovu sirovih podataka, A, B, C zajednička projekcija skorova za crveni, plavi i zeleni kanal, redom.

Grafik vektora latentnih varijabli pokazuje povezanost između varijabli i može se koristiti za identifikaciju varijabli sa doprinosom na razdvajanje uzoraka na grafiku odnosa prve dve glavne komponente. Zajednička projekcija vektora latentnih varijabli i $PC1$, za sva tri kanala je prikazana na Slici 21. Grafici vektora latentnih varijabli pre i nakon

procedure savijanja su identični i pokazuju uticaj varijabli sa vrednostima 0,33; 0,36; 0,42; 0,46 i 0,36 kao varijable sa najvećim uticajem na PC1. Upravo ove varijable su odgovorne za razdvajanje uzoraka propolisa na oranž i plavi tip. Uzorak **35** potiče iz Hrvatske, a prema HPTLC studiji pripada plavom tipu propolisa. Sa druge strane, ovaj uzorak je prema grafiku glavnih komponenata klasifikovan kao oranž tip propolisa [65].

Tabela 5. Statistički parametri PCA i PLS-DA modela za sva tri kanal

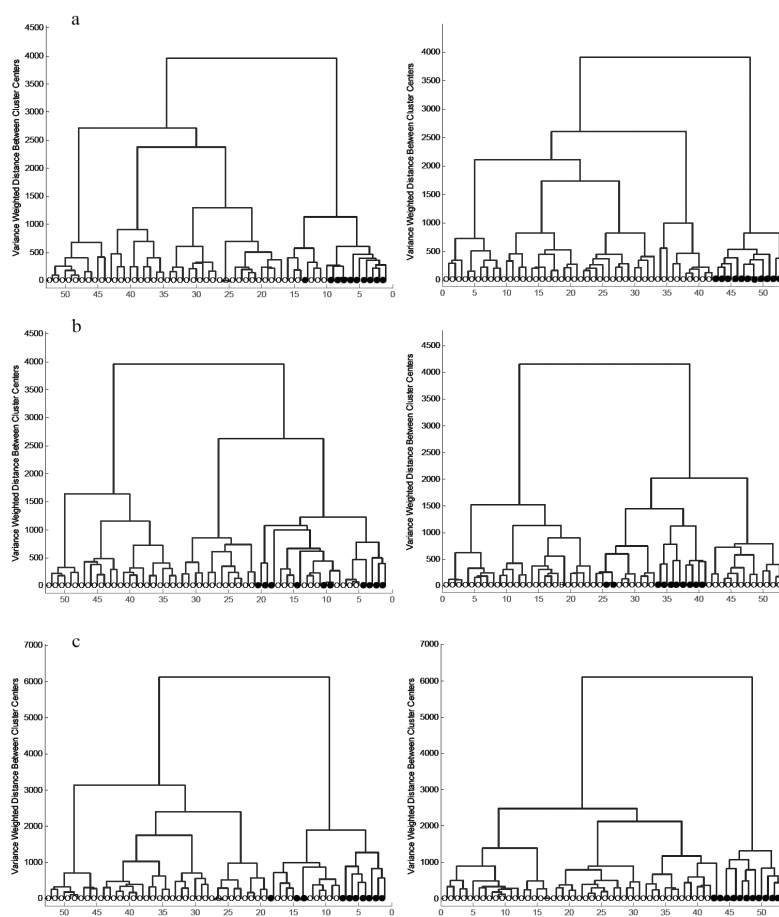
		Statistički parametri za PCA i PLS-DA modele					
		Crveni kanal		Plavi kanal		Zeleni kanal	
		Sirovi podaci	Nakon DTW procedure	Sirovi podaci	Nakon DTW procedure	Sirovi podaci	Nakon DTW procedure
PCA	Broj PC komponenta	6	4	5	5	5	6
	Ukupan varijabilitet modela	93,63	85,51	84,93	86,16	86,69	87,50
	Varijabilitet prema – $PC1/PC2$	50,40/22,41	51,98/17,49	37,37/19,87	39,92/21,00	40,68/21,23	44,58/16,75
	Broj LV	3	2	-	-	2	2
	R_{cal}^2	0,7025	0,8313	-	-	0,7778	0,9400
PLS-DA	R_{cal}^2	0,5516	0,8112	-	-	0,6507	0,9084
	R_{cal}^2	0,8187	0,8878	-	-	0,7874	0,9648
	RMSEC	0,2093	0,1542	-	-	0,1809	0,0979
	RMSECV	0,2583	0,1738	-	-	0,2273	0,1231
	RMSEP	0,1858	0,1499	-	-	0,2097	0,0793
Koren srednjeg kvadratnog odstupanja (root mean squared error, RMSE) koji može biti određen za kalibraciju (RMSEC), unakrsnu validaciju (RMSECV) i predikciju (RMSEP).							



Slika 21. PCA grafici vektora latentnih varijabli propolisa nakon procedure savijanja prema dobijenim HPTLC hromatogramima.

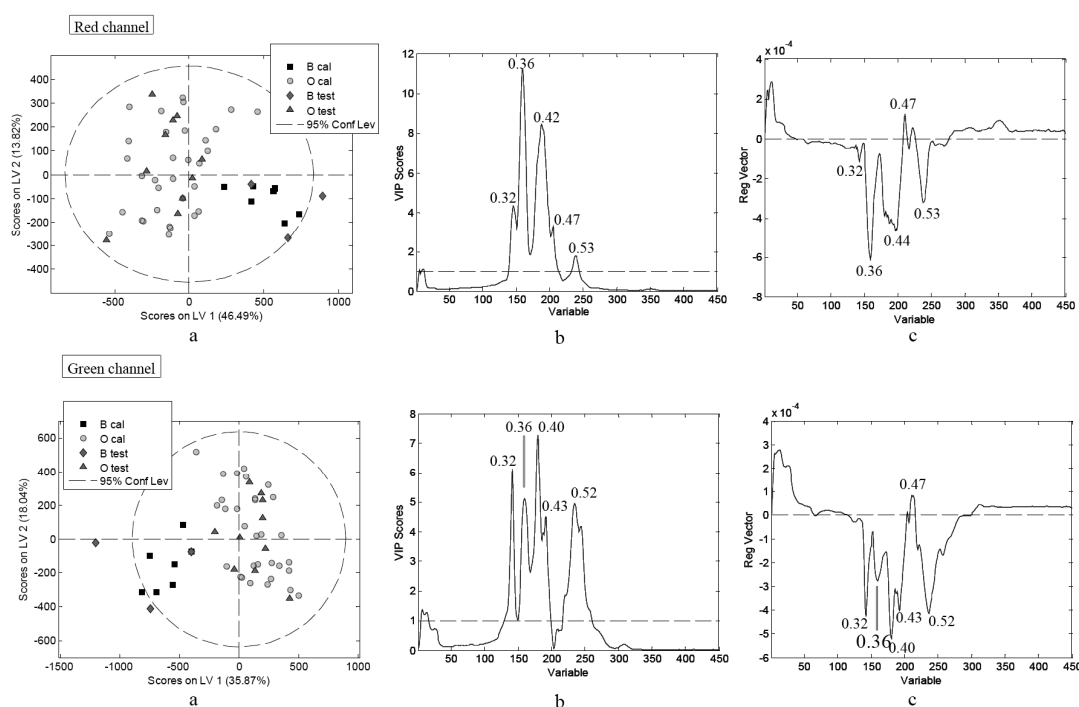
Aglomerativna hijerarhijska analiza je primenjena kao analiza kojom je set multivarijantnih podataka preveden u klastere kako bi se olakšalo razumevanje rezultata dobijenih na osnovu PCA. Najbolja razdvajanja između dva tipa propolisa su dobijena za crveni i zeleni kanal, slično kao i kod PCA. Wardovo pravilo je korišćeno kao najpouzdanije za određivanje optimalnog rastojanja između klastera. U slučaju crvenog i zelenog kanala uzorci formiraju dva klastera na rastojanju 2700 i 3100 jedinica. U slučaju

sirovih podataka, jedan klaster se uglavnom sastoji od uzoraka koji pripadaju oranž tipu, dok je drugi klaster izgrađen uglavnom od uzoraka koji pripadaju plavom tipu propolisa. Dendrogram dobijen primenom procedure savijanja, pokazuje prisustvo dva klastera koja su uglavnom sastavljeni od oranž i plavog tipa. Uprkos jasnom razdvajanju prema crvenom i zelenom kanalu, plavi kanal ne pokazuje dobro razdvajanje. Uzorak **39** je klasifikovan kao oranž propolis, slično kao i na grafiku skorova kod PCA. Ovaj uzorak ne sadrži vosak te se izdvaja od drugih. Rezultati dobijeni za plavi kanal se ne mogu koristiti kao reprezentativni. Poređenjem klasifikacija dobijenih primenom nadziranih i nenadziranih tehnika, mogu se dobiti dobri rezultati za crveni i zeleni kanal [65].



Slika 22. Dendrogram za (A) crveni, (B) plavi i (C) zeleni kanal pre (levo) i posle (desno) DTW procedure. ○ – oranž tip, ● – plavi tip

Klasifikacija dobijena za dva tipa propolisa je ispitivana primenom metode delimičnih najmanjih kvarata sa diskriminantnim pristupom (PLS-DA) kao definisane tehnike, koja određuje koje su varijable značajne za klasifikaciju uzoraka na dva tipa. PLS-DA je primenjena na dva seta podataka, pre i nakon procedure savijanja. Broj latentnih varijabli je izabran prema najmanjoj razlici između grešaka $RMSECV$ i $RMSEC$, što se postiže za dve ili tri latentne varijable. Klasifikacija i validacija četiri modela su izražene kao R^2_{izr} , R^2_{kv} , $RMSEC$ i $RMSECV$ i predstavljene u Tabeli 3. Parametri modela za PLS-DA su statistički značajni za R^2_{izr} i R^2_{kv} , kao i najmanja razlika između $RMSEC$, $RMSECV$, pre i nakon primene procedure savijanja [65].

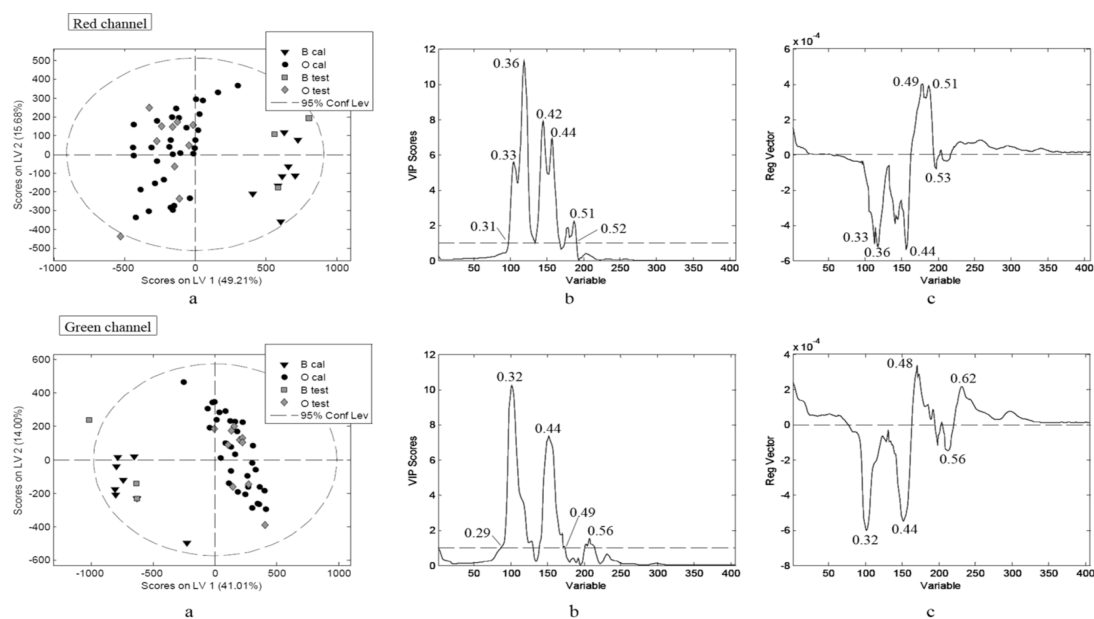


Slika 23. PLS-DA model dobijen na sirovim podacima: a) grafik skorova podataka, b) grafik varijabli prema VIP skoru, c) grafik regresionih koeficijenata, za dva modela prema crvenom i zelenom kanalu.

Na osnovu grafika skorova latentnih varijabli sirovih podataka (Slika 23) i nakon primene procedure savijanja (Slika 24) može se uočiti jasno razdvajanje između dva tipa propolisa. Doprinos pojedinih varijabli sa uticajem na razdvajanje oba tipa propolisa je određen primenom projekcionih vektora. Varijable sa VIP vrednostima većim od 1 se

navode kao najznačajnije, a standardizovani regresioni koeficijenti određuju značaj pojedinih promenljivih u regresionom modelu. Identična jedinjenja su odgovorna za razdvajanje za sva tri kanala. Fenoli najznačajniji za razdvajanje sva tri kanala su na R_F vrednostima 0,33; 0,36; 0,42 i 0,44 za crveni kanal i 0,32, 0,36, 0,44 i 0,51 za zeleni kanal. Sve varijable izuzev 0,31 imaju negativan uticaj na PLS-DA model. Fenoli na R_F vrednostima 0,32 i 0,36 pokazuju najveći doprinos [65].

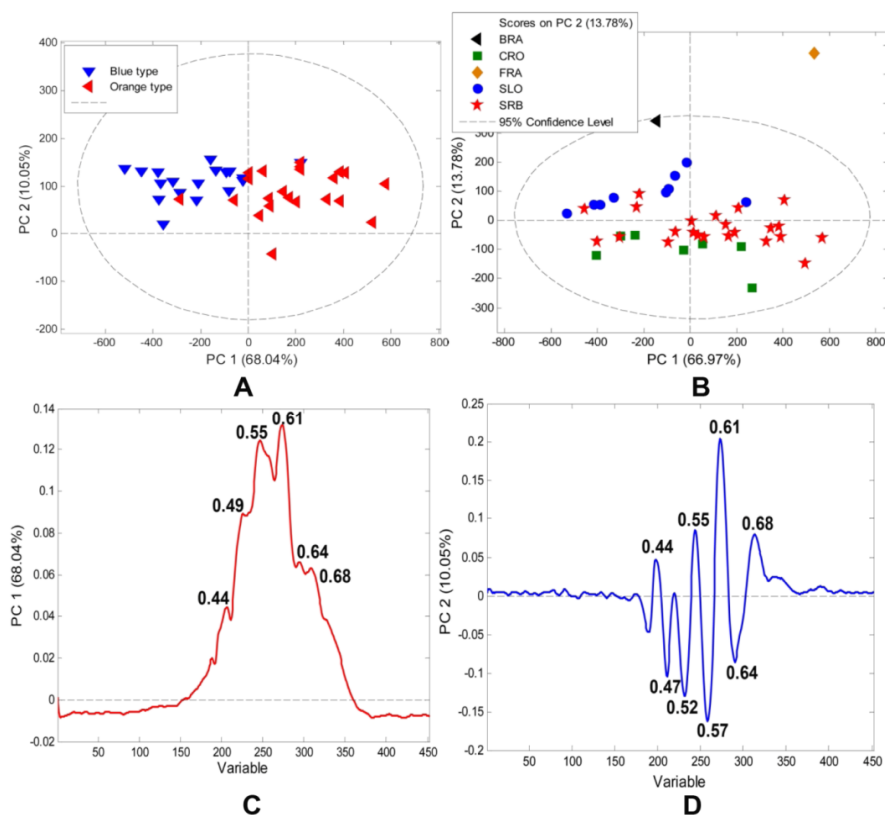
U cilju predviđanja klasifikacije nepoznatih uzoraka, uzorci su podeljeni na dva seta, kalibracioni i test set koji se sastoji iz slučajno odabranih uzoraka primenom kros-validacione procedure. Kalibracioni set se sastoji od 32 uzorka (od ukupno 42 uzorka oranž tipa) i 7 (od ukupno 10 plavih), dok test set čine ostali uzorci. Statistički parametri modela su prikazani u Tabeli 6. Dobra prediktivnost PLS-DA modela je potvrđena grafikom skorova za kalibracioni i test set. Dobijeni statistički modeli su korišćeni za dalju klasifikaciju uzoraka. Na osnovu Slika **23** i **24** može se uočiti bolja klasifikacija uzoraka primenom procedure savijanja. Iste varijable su prepoznate kao značajne za klasifikaciju, bez obzira na primenjenu proceduru savijanja. U ovom radu određeni su najznačajniji signali za klasifikaciju ispitivanih ekstrakata [65].



Slika 23. PLS-DA model dobijen nakon procedure savijanja, a) grafik skorova podataka, b) grafik varijabli prema VIP skoru, c) grafik regresionih koeficijenata, za dva modela prema crvenom i zelenom kanalu.

4.1.3. Klasifikacija srpskog, slovenačkog i hrvatskog propolisa zasnovana na HPTLC analizi

PCA je primenjena na uzorke propolisa koji potiču iz Srbije, Slovenije, Hrvatske, Brazila i Francuske u cilju razdvajanja po botaničkom i geografskom poreklu. Na osnovu Slike 25 mogu se uočiti razlike u fenolnom profilu pomenutih uzoraka. Uzorci francuskog i brazilskog propolisa su prepoznati kao spoljašnje vrednosti. Prema Slici 25A može se uočiti razlika prema botaničkom poreklu, te uzorci koji se nalaze sa leve strane plotu pripadaju plavom tipu, za razliku od uzoraka koji se nalaze sa desne strane koji pripadaju oranž tipu propolisa.



Slika 25. PCA slovenačkog, hrvatskog i srpskog propolisa zasnovana na HPTLC metodi. Uzorci srpskog propolisa su pozicionirani između slovenačkog i hrvatskog (Slika 25B).

U slučaju slovenačkog propolisa dominira plavi tip. Prema PC grafiku skorova ovi uzorci su izdvojeni u donjem levom uglu. Prema geografskom poreklu (bez isključenih spoljašnjih vrednosti) prve dve komponente opisuju 80,73% od ukupnog varijabiliteta. Prema grafiku latentnih varijabli fenoli sa R_F vrednostima 0,49; 0,33 i 0,61 pokazuju najveći uticaj na razdvajanje propolisa po botaničkom poreklu. Može se uočiti da $PC2$ utiče na razdvajanje prema geografskom poreklu. Idući od negativnih ka pozitivnim vrednostima duž $PC1$ ose može se zapaziti da fenoli sa R_F vrednostima 0,61, 0,33 i 0,68 imaju najveći pozitivan uticaj, dok fenoli sa R_F vrednostima 0,37 i 0,32 pokazuju negativan uticaj na $PC2$ (Slika 25, C, D).

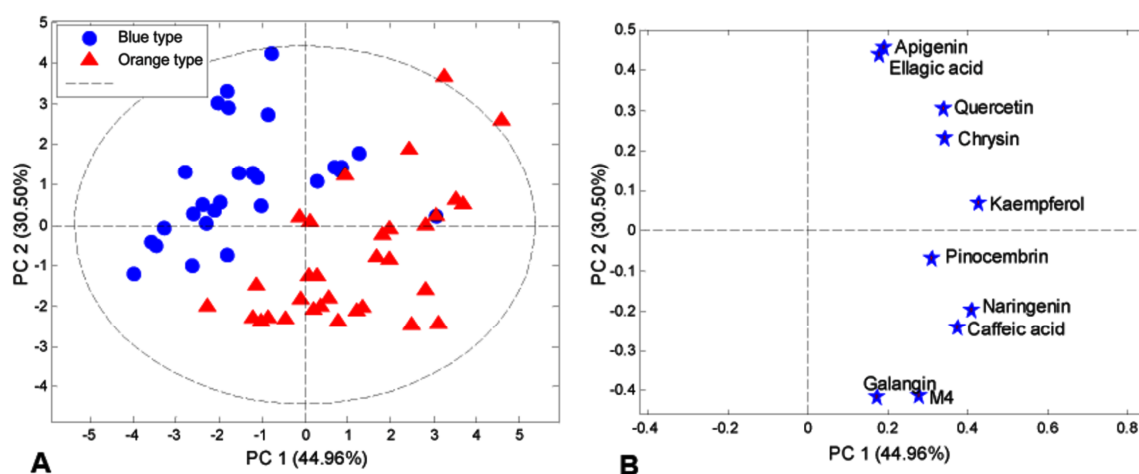
4.1.4. Multivarijantna analiza nemačkog propolisa zasnovana na HPTLC

U ovoj studiji su primenjene multivarijantne tehnike (PCA i HCA) u cilju klasifikacije nemačkog propolisa i LDA u cilju predviđanja klasifikacije nepoznatih uzoraka [73].

4.1.4.1. Analiza glavnih komponenata (PCA)

PCA primenjena na autoskalirane (centrirane i skalirane na jediničnu standardnu devijaciju) uzorke nemačkog propolisa daje model izgrađen od tri komponente koje objašnjavaju 84,16 % od ukupnog varijabiliteta. PC1 obuhvata 44,96 % od ukupnog varijabiliteta, dok kumulativna varijansa objašnjena pomoću prve dve komponente iznosi 73,46%. Pet uzoraka je proglašeno spoljnim vrednostima te su odstranjeni iz seta podataka.

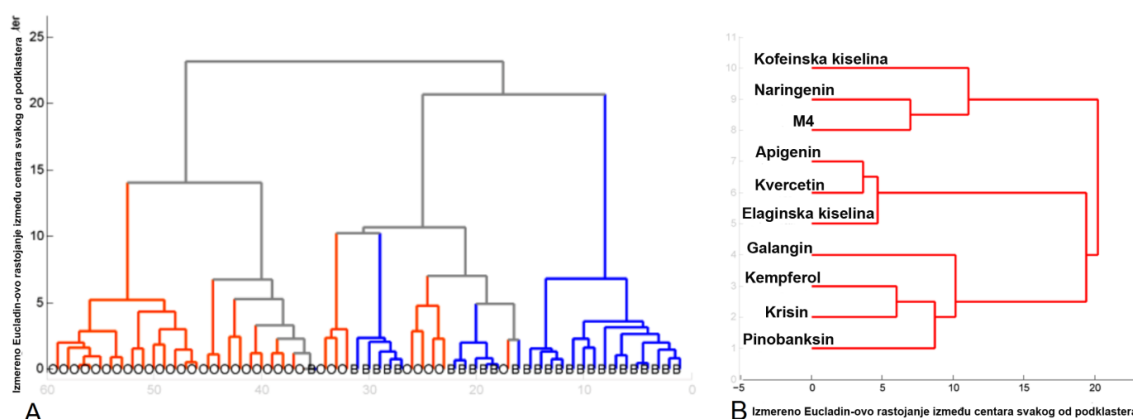
Kao što se vidi sa Slike 26, kempferol, naringenin i kofeinska kiselina imaju pozitivan uticaj na PC1. Nepoznato jedinjenje M4, za koje se pretpostavlja da je pinobanksin pokazuje negativan uticaj na PC2. Apigenin i elaginska kiselina imaju pozitivan uticaj na PC2. Takođe, galangin, kempferol i naringenin su karakteristični za oranž tip nemačkog propolisa. Ovi rezultati potvrđuju pretpostavku da nemački kao i srpski, slovenački i hrvatski propolisi pokazuju dva tipa [68].



Slika 26. PCA nemačkog propolisa primenjena na podatke dobijene HPTLC metodom.

U cilju potvrde grupisanja propolisa prema PCA metodi, primenjena je hijerarhijska klsterska analiza (HCA) na matricu podataka HPTLC hromatograma, koja se sastoji od 27 uzoraka plavog tipa i 32 oranž tipa propolisa. Izdvajaju se tri klastera, pri nivou sličnosti od 20%. Desni klaster sadrži 13 uzoraka propolisa plavog tipa, dok levi sadrži 24 uzorka oranž tipa i 1 plavog tipa. Treći klaster, koji se nalazi između ova dva sadrži 11 uzoraka plavog i 8 uzoraka oranž tipa propolisa (Slika 27). Klsterska analiza zasnovana na varijablama formira tri klastera pri nivou sličnosti od 13% [68].

HCA primenjena na varijable HPTLC profila, pokazuje tri klastera pri nivou sličnosti od 15% [73]. Pinobanksin, krisin, kempferol i galangin kao fenoli karakteristični za propolis topola tipa grade jedan klaster. Ovi fenoli su mahom karakteristični za oranž tip propolisa. Pinobanksin, naringenin i kofeinska kiselina daju plave i zelene zone, te su identifikovani u plavom tipu propolisa.



Slika 27. Dendrogram uzoraka propolisa i promenljivih dobijen na osnovu HPTLC.

4.1.4.2. Linearna diskriminantna analiza (LDA)

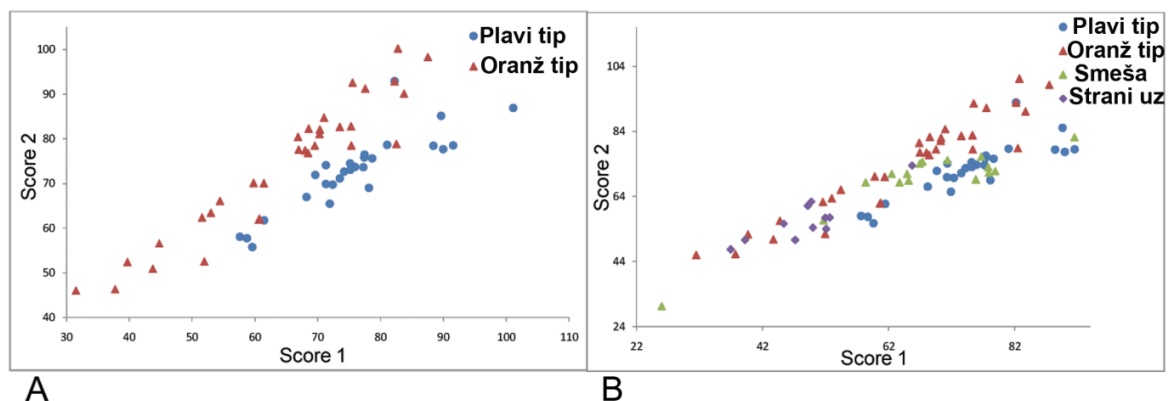
Linearna diskriminantna analiza je možda najviše korišćena definisana multivarijantna tehnika u cilju klasifikacije i predviđanja klasifikacije nepoznatih uzoraka na osnovu kalibracionog modela. Sposobnost klasifikacije LDA modela je iskazana procentom klasifikacije kalibracionog seta, primenom kros-validacione procedure. Na osnovu vrednosti izračunatih standardizovanih kanonijskih koeficijenata mogu se

identifikovati varijable najznačajnije za razdvajanje oba tipa propolisa i predvideti grupna pripadnost nepoznatih uzoraka. LDA je primenjena na set podataka od 39 uzoraka koji čine kalibracioni i 27 koji čine test set. Test set je izgrađen od uzoraka koji su smeša dva tipa propolisa tj. oranž i plavog kao i uzorci inostranih propolisa, koji pokazuju različit HPTLC profil od prethodno navedena dva tipa. Prema vrednostima standardizovanih kanonijskih koeficijenata, varijable sa najvećim diskriminantnim uticajem su kofeinska kiselina, naringenin, apigenin i kvercetin [73].

Tabela 6. Standardni kanonijski koeficienti za odabrane varijable LDA modela zasnovane na HPTLC analizi.

Standardni kanonijski koeficijenti diskriminantne funkcije	
Varijable	Faktor 1
Galangin	-0,017
M4	0,144
Naringenin	0,720
Kofeinska kiselina	0,426
Kempferol	0,306
Elaginska kiselina	-0,022
Kvercetin	-0,814
Apigenin	-0,026

Klasifikacija uzoraka oranž i plavog tipa propolisa dobijena prema LDA modelu iznosi 96,6%, dok primenom kros-validacione metode 91,3%. Uzorci plavog tipa propolisa su klasifikovani sa boljom preciznošću (96,3%) nego oranž tip (87,3%). Linearni diskriminantni skorovi oba tipa uzoraka se mogu izračunati na osnovu dole prikazanih jednačina:



Slika 28. Grafik linearnih diskriminantnih skorova ispitivanih uzoraka prema HPTLC metodi (A-kalibracioni set, B-test set).

Plavi

$$D_1 = 17,963 \cdot \text{Galangin} + 41,707 \cdot M_4 - 1,998 \cdot \text{Naringenin} - 3,094 \cdot \text{Kafeinska kiselina} \\ - 48,966 \cdot \text{Kaempferol} - 48,142 \cdot \text{Elaginska kiselina} + 30,266 \cdot \text{Kvercetin} \\ + 219,737 \cdot \text{Apigenin} - 36,989$$

Oranž

$$D_2 = 17,437 \cdot \text{Galangin} + 46,943 \cdot M_4 - 19,243 \cdot \text{Naringenin} + 10,443 \cdot \text{Kafeinska kiselina} \\ - 38,778 \cdot \text{Kaempferol} - 49,143 \cdot \text{Elaginska kiselina} + 13,218 \cdot \text{Kvercetin} - 218,069 + 44,387$$

Može se zaključiti da su inostrani uzorci grupisani između oba tipa propolisa, što bi se moglo objasniti različitim botaničkim poreklom i pripadnošću oranž ili plavom tipu propolisa. Takođe, smeša oba tipa propolisa je grupisana kao plavi i oranž tip u zavisnosti od hemijskog sastava [68] (Slika 28).

Tabela 7. LDA klasifikacija uzoraka kalibracionog seta za oranž i plavi tip propolisa.

Klasifikacija rezultata				
% Klasifikacije	Tip propolisa	Stepen predviđanja grupnog članstva		
		Plavi tip	Oranž tip	Ukupno
Originalni	Plavi	26	1	27
	Oranž	1	31	32
	%	Plavi	96,30	3,70
		Oranž	3,10	96,90
Kros-validaciona procedura	Plavi	26	1	27
	Oranž	4	28	32
	%	Plavi	96,30	3,70
		Oranž	12,30	87,30

4.2. Spektrofotometrijsko ispitivanje fenolnog profila srpskog propolisa

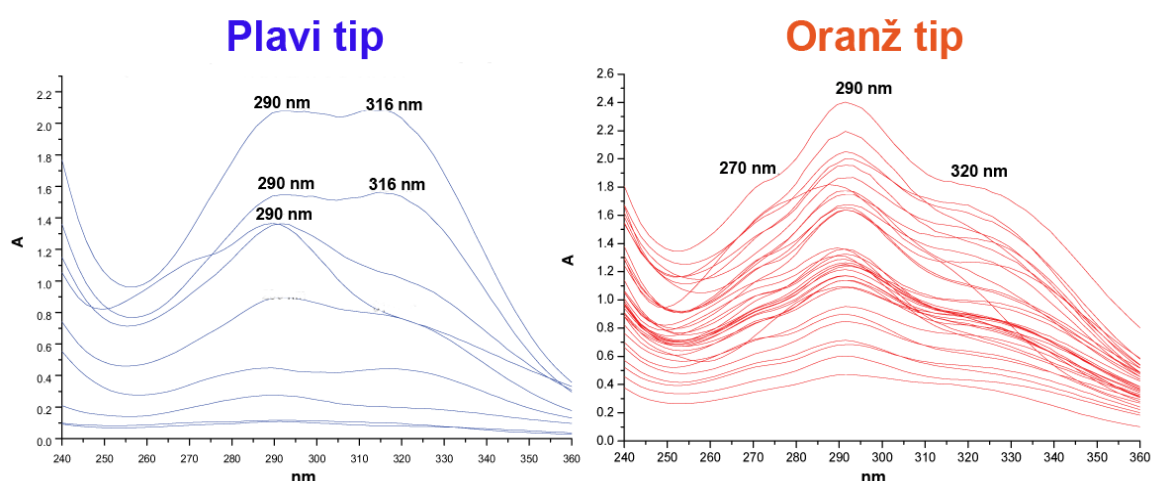
4.2.1. UV/VIS spektri propolisa

Na osnovu izgleda UV/VIS spektara ispitivanih uzoraka, može se uočiti da uzorci koji pripadaju oranž tipu propolisa imaju apsorpcione maksimume na $\lambda = 270$ nm, 290 nm i 320 nm, dok uzorci koji pripadaju plavom tipu propolisa imaju apsorpcione maksimume na $\lambda = 290$ i 316 nm. Prema literaturi većina fenolnih jedinjenja ima tri apsorpciona maksimuma na talasnim dužinama $\lambda = 288$, 290 nm i 320 nm. Tabela 8 prikazuje apsorpcione maksimume flavonoida karakteristične za propolis topola tipa. Prema tome, apsorpcioni maksimumi oranž propolisa bi mogli poticati od krisina (270 nm), kvercetina (290 nm), apigenina (268 nm), kempferola (268 nm), kao i kofeinske kiseline (274 nm) [40,72].

Tabela 8. Apsorpcioni maksimumi flavonoida karakterističnih za propolis [40.72].

Br. jedinjenja	Flavonoidi	λ_{\max} nm
1	Apigenin	268, 336
2	Krisin	270, 313, 324
3	Kvercetin	294, 370
4	Kempferol	268, 294, 367
3	Galangin	339
6	Pinocembrin	290
7	CAPE	238, 298, 328
8	Kofeinska kiselina	274, 296, 332
9	Pinobanksin-metiletar	288
10	<i>p</i> -Kumarinska kiselina	286, 209, 220

Apsorpcioni maksimumi uzoraka koji pripadaju plavom tipu propolisa najverovatnije potiču od pinocembrina (290 nm), kofeinske kiseline (296 nm) i pinobanksin metil etra (288 nm). Takođe, ove talasne dužine odgovaraju apsorpcionim maksimumima krisina i kvercetina, koji su prisutni u znatno manjim količinama u odnosu na oranž tip, te se njihov uticaj može zanemariti. Prema HPTLC studiji, plave zone potiču uglavnom od fenolnih kiselina prisutnih u propolisu kao što su *p*-kumarinska kiselina, te mogu uticati na apsorpcione maksimume ispitivanih uzoraka. Ove kiseline imaju apsorpcione maksimume na $\lambda = 286$ nm [40].

**Slika 29.** UV/VIS spektri oranž i plavog propolisa.

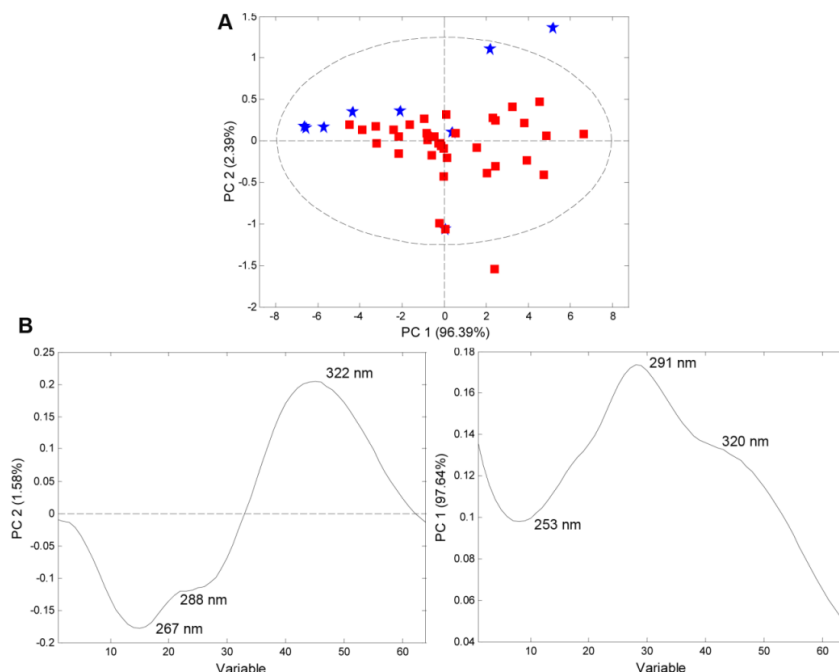
Galangin ima apsorpcione maksimume na $\lambda = 294$ nm i 318 nm i predstavlja karakterističan flavonoid za plavi tip propolisa prema HPTLC studijama [72]. Dalje, kofeinska kiselina ima maksimume apsorpcije na $\lambda = 396$ nm i 332 nm.

4.2.2. Multivarijantna analiza UV spektara propolisa

4.2.2.1. Analiza glavnih komponenata

Analiza glavnih komponenata je primenjena koristeći srednje centriranje na set podataka od 48 uzorka i 64 varijable, dobijene na osnovu apsorpcionih spektara propolisa u opsegu talasnih dužina od 240 do 360 nm. Prema grafiku skorova, oranž tip propolisa je razdvojen od plavog duž ose $PC2$. Uzorci **35** i **51** predstavljaju spoljne vrednosti, jer se nalaze van *Hotelling* T^2 elipse. Uzorak broj **35** potiče iz Hrvatske i njegovo geografsko poreklo diktira njegov položaj na PC grafiku skorova, dok uzorak **51** pokazuje nešto drugačiji HPTLC profil [65]. Prva komponenta objašnjava 96,39%, dok prve dve opisuju 98,78% od ukupnog varijabiliteta. Varijabla $\lambda = 290$ nm pokazuje najveći uticaj na $PC1$, koja ne razdvaja plavi i narandžasti propolis, što se i može očekivati jer spektri oba tipa propolisa sadrže apsorpcioni maksimum na ovoj talasnoj dužini. Varijable na $\lambda = 253$ nm i 320 nm takođe pokazuju pozitivan doprinos na $PC1$. Na ovim talasnim dužinama mogu apsorbovati fenoli kao što su kvercetin, kofeinska kiselina i galangin. Apsorpcioni maksimum na talasnoj dužini $\lambda = 320$ nm mogao bi odgovarati krisinu i galanginu (Tabela 8). Uzajamne projekcije skorova i odgovarajućih koeficijenata latentnih varijabli za prve dve glavne komponente prikazane su na Slici 30.

Na osnovu $PC2$ mogu se razlikovati dve grupe propolisa. Najveći uticaj na $PC2$ imaju varijable $\lambda = 267$, 288 i 320 nm kao najznačajnije za razdvajanje. Apigenin i kempferol imaju apsorpcioni maksimum koji odgovara talasnoj dužini na 268 nm [39], što ukazuje na njihov doprinos na $PC2$. Apsorpcioni maksimum na $\lambda = 288$ nm bi mogao poticati od pinobanksin-metiletra, koji je identifikovan u uzorcima propolisa primenom UPLC-Orbitrap MS/MS metode. Ova komponenta je identifikovana u uzorcima nemačkog propolisa i na HPTLC hromatogramu se detektuje kao plava zona [64]. Varijabla na $\lambda = 320$ nm bi mogla poticati od krisina ($\lambda = 324$ nm) i CAPE ($\lambda = 328$ nm) [40].



Slika 30. Grafik skorova PC1/PC2 (A) i grafici koeficienata latentnih varijabli (B) na osnovu UV/VIS spektralnih podataka.

4.3. Ispitivanje fenolnog sastava i antioksidativne aktivnosti propolisa cikličnom voltametrijom

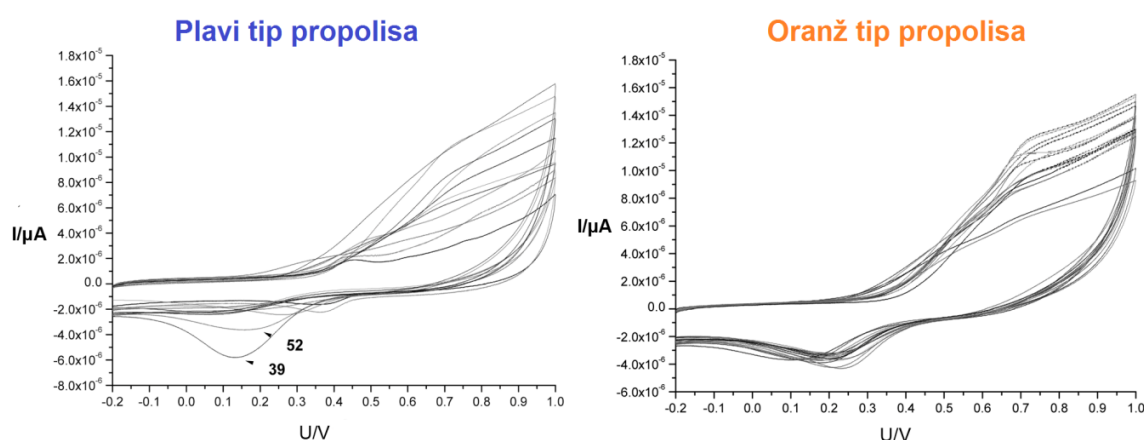
4.3.1. Ispitivanje cikličnih voltamograma i antioksidativne aktivnosti propolisa

Na osnovu oblika cikličnih voltamograma ekstrakata srpskog propolisa, može se uočiti razlika između dva prethodno opisana tipa propolisa. Ciklični voltamogrami uzoraka koji pripadaju oranž i plavom tipu propolisa su prikazani na Slici 31. Nekoliko parametara kao što su intenzitet struje, elektrodni potencijal, vrednost Q_{700} se mogu koristiti za ispitivanje sadržaja fenola i antioksidativne aktivnosti propolisa. Faktor Q_{700} predstavlja ukupnu vrednost površine ispod talasa oksidacije za ispitivane propolise. S obzirom da najveći broj uzoraka ima anodni pik na potencijalu 700 mV, ovaj faktor se imenuje kao Q_{700} .

Intenzitet struje se može dovesti u vezu sa količinom fenolnih jedinjenja u propolisu. Intenzitet struje uzoraka koji su klasifikovani kao plavi tip propolisa pokazuje

značajno niži opseg od $1,28 \cdot 10^{-6}$ A do $10,66 \cdot 10^{-6}$ A, dok uzorci koji su klasifikovani kao oranž tip imaju raspon intenziteta struje od $1,57 \cdot 10^{-6}$ A do $16,80 \cdot 10^{-6}$ A. Na osnovu ovih rezultata se može zaključiti da oranž tip propolisa ima veći sadržaj fenolnih jedinjenja. Takođe ovi rezultati su u saglasnosti sa spektrofotometrijski određivanim sadržajem ukupnih fenola i flavonoida, kao i sa rezultatima dobijenim UPLC-Orbitrap masenom metodom.

Vrednost elektrodnog potencijala ukazuje na antioksidativni kapacitet ekstrakata propolisa. Potencijali oksidacije oba tipa propolisa prikazani su u Tabeli 9.



Slika 31. Ciklični voltamogrami ekstrakata propolisa

Na osnovu Slike 31 se može uočiti da postoji razlika između uzoraka plavog tipa propolisa, pri čemu se uzorci **52** i **39** izdvajaju od ostalih. E_{pa2} vrednost oranž propolisa je u opsegu od 0,505 V do 0,589 V, za uzorke koji pripadaju plavom tipu od 0,491 V do 0,601 V, dok E_{p3} za oranž obuhvata opseg od 0,663 V do 0,781 V, a za plavi tip propolisa od 0,694 V do 0,797 V. Na osnovu prethodno navedenog, nameće se zaključak da se uzorci koji pripadaju oranž tipu propolisa lakše oksiduju tj. pokazuju jači antioksidativni kapacitet. S obzirom da propolis predstavlja smešu fenolnih jedinjenja, teško je identifikovati doprinos pojedine komponente iz propolisa antioksidativnoj moći, ali se može pretpostaviti da najzastupljenije komponente najviše utiču. Za razliku od uzoraka koji pripadaju oranž tipu, skoro svi uzorci koji pripadaju plavom tipu propolisa imaju E_{p1} vrednost (Tabela 9). Uzorci **15**, **23**, **48** koji pripadaju plavom tipu pokazuju međusobno slične voltamograme sa E_{p1} vrednostima na 0,332 V, 0,421 V i 0,444 V. Uzorci **15** i **18** koji pripadaju plavom tipu

propolisa ne sadrže E_{P2} potencijal, što ih u mnogome razdvaja od uzoraka koji pripadaju oranž tipu propolisa. Parametar Q_{700} ili površina ispod anodnog pika predstavlja meru antioksidativnog potencijala ispitivanog propolisa. Površina Q_{700} plavog propolisa je manja od površine oranž propolisa, što ukazuje na veću antioksidativnu moć oranž propolisa. Vrednost Q_{700} za plavi tip propolisa varira od 0,12 do 1,83 C, dok je za oranž tip od 0,24 do 4,57 C što ukazuje na njegovu značajno veću antioksidativnu aktivnost. Slični rezultati su dobijeni spektrofotometrijskom metodom uz korišćenje DPPH.

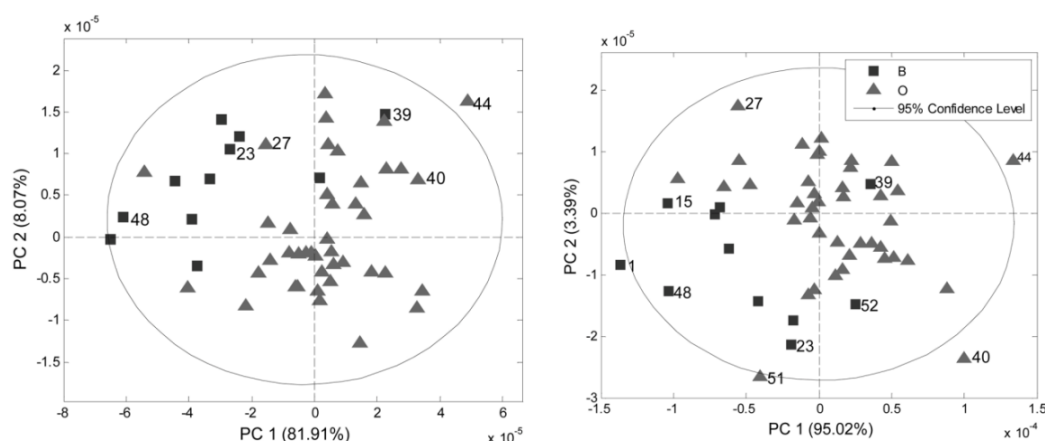
Tabela 9. Elektrohemijski parametri dobijeni cikličnom voltametrijom.

	Klasa		Epa ₁ (V)	Epa ₂ (V)	Epa ₃ (V)	Ipa ₁ (10 ⁻⁶ μA)	Ipa ₂ (10 ⁻⁶ μA)	Ipa ₃ (10 ⁻⁶ μA)	Epc (V)	Ipc (10 ⁻⁶ μA)	Q ₇₀₀
2	Oranž	2		0,505	0,680		4,67	8,71	0,189	-1,33	1,55
3	Oranž	3		0,533	0,727		4,32	6,75	0,201	-3,45	1,55
6	Oranž	6			0,676			8,94	0,188	-3,85	1,55
7	Oranž	7		0,573	0,724		7,01	11,65	0,147	-3,88	3,56
8	Oranž	8		0,540	0,685		5,75	9,05	0,218	-3,88	2,62
9	Oranž	9		0,531	0,686		5,34	8,41	0,223	-3,88	2,32
10	Oranž	10		0,552	0,686		4,54	6,62	0,203	-3,35	0,88
11	Oranž	11		0,548	0,726		6,00	12,36	0,179	-3,95	3,53
12	Oranž	12		0,551	0,726		6,30	12,11	0,170	-3,88	3,25
13	Oranž	13		0,538	0,704		5,49	10,46	0,201	-3,18	2,95
14	Oranž	14		0,558	0,731		6,46	11,35	0,112	-3,68	2,92
16	Oranž	16		0,539	0,670		5,78	8,26	0,210	-3,33	1,61
17	Oranž	17		0,539	0,695		6,48	11,12	0,229	-4,50	3,91
19	Oranž	19		0,564	0,742		5,91	10,73	0,149	-3,82	2,37
20	Oranž	20		0,549	0,73		4,93	9,78	0,197	-3,80	2,30
21	Oranž	21		0,567	0,714		6,41	9,50	0,208	-4,30	2,67
22	Oranž	22		0,558	0,743		5,45	9,41	0,229	-3,10	0,24
24	Oranž	24		0,505	0,687		5,58	10,09	0,179	-3,80	2,26
23	Oranž	25		0,536	0,715		5,98	9,35	0,158	-4,30	2,12
26	Oranž	26		0,535	0,725		6,43	11,81	0,153	-4,30	3,17
27	Oranž	27			0,728			7,18	0,118	-3,98	1,16
28	Oranž	28		0,548	0,712		5,38	9,93	0,165	-3,50	3,04
29	Oranž	29		0,544	0,702		3,75	5,11	0,246	-2,81	0,47
30	Oranž	30		0,520	0,695		4,60	8,79	0,175	-2,95	1,81
31	Oranž	31	0,373	0,525	0,663	1,57	4,67	6,63	0,255	-3,23	0,57
32	Oranž	32		0,585	0,728		6,91	10,79	0,162	-4,54	1,58

33	Oranž	33		0,529	0,711		6,22	12,55	0,204	-4,54	3,79
34	Oranž	34		0,546	0,748		6,86	15,10	0,213	-5,04	4,57
36	Oranž	36		0,560	0,717		5,96	10,55	0,193	-3,80	2,26
37	Oranž	37		0,583	0,781		7,96	13,02	0,119	-4,27	3,07
38	Oranž	38		0,539	0,711		5,45	9,36	0,185	-3,40	2,71
40	Oranž	40		0,589	0,739		8,75	15,11	0,167	-5,20	3,79
41	Oranž	41		0,545	0,726		5,53	10,08	0,204	-3,88	2,66
42	Oranž	42		0,526	0,704		6,71	12,18	0,199	-4,54	3,84
43	Oranž	43		0,536	0,705		6,11	10,53	0,190	-4,20	2,75
44	Oranž	44		0,540	0,755		9,14	16,80	0,145	-6,00	3,79
43	Oranž	45		0,531	0,695		6,06	9,22	0,186	-4,04	2,02
46	Oranž	46		0,536	0,699		8,12	12,79	0,215	-5,22	4,14
47	Oranž	47			0,737			12,93	0,159	-5,30	2,55
49	Oranž	49		0,562	0,768		6,73	11,25	0,148	-5,42	2,77
30	Oranž	50			0,727			12,46	0,119	-4,00	2,60
31	Oranž	51			0,717			8,09			1,09
1	Plavi	1	0,457	0,613	0,715	1,28	2,21	3,14	0,356	-0,92	0,28
4	Plavi	4			0,719			6,88	0,143	-1,88	1,83
5	Plavi	5		0,491	0,694		3,12	6,11	0,109	-2,25	0,28
15	Plavi	15	0,332	0,601		1,99	3,53		0,133	-1,81	0,12
18	Plavi	18	0,489			3,56			0,266	-2,47	0,35
23	Plavi	23	0,421	0,518	0,750	2,12	3,44	9,13	0,200	-2,05	1,02
35	Plavi	35			0,712			8,56	0,102	-2,13	0,82
39	Plavi	39			0,715			10,66	0,128	-5,80	1,03
48	Plavi	48	0,444		0,797	2,15		5,52	0,361	-2,43	0,31
52	Plavi	52		0,557	0,711		5,83	10,55	0,167	-3,64	1,65
53	Plavi	53			0,746			7,98	0,101	-2,42	0,57

4.3.2. Multivarijantna analiza rezultata dobijenih cikličnom voltametrijom

PCA je primenjena koristeći srednje centriranje na matricu podataka iz cikličnih voltamograma za oksidacionu i redukcionu struju ponaosob. Na osnovu grafika skorova (Slika 32) može se uočiti razdvajanje uzoraka po tipu propolisa, pri čemu oksidaciona struja daje bolje razdvajanje. To je i očekivano s obzirom da su reverzibilni voltamogrami uzoraka propolisa slični, izuzev uzoraka **39** i **52** koji pokazuju nešto nižu redukcionu struju. Na osnovu PCA modela dobijenog za oksidacionu struju, $PC1$ obuhvata 81,92% varijabiliteta, a $PC2$ 8,07 %. Uzorci **15**, **23** i **48** pokazuju različito ponašanje u odnosu na ostale, što je u saglasnosti sa rezultatima dobijenim prethodnim metodama. Prema PCA grafiku skorova, uzorak **44** je spoljnu vrednost. Vrednosti skorova, odnosno njihova uzajamna projekcija, za prve dve glavne komponente prikazana je na Slici 32. Na osnovu grafika skorova PCA model za redukcionu struju ukazuje na prisustvo dve grupe propolisa, pri čemu se uzorci **39** i **52** grupišu sa uzorcima koji pripadaju oranž tipu propolisa. $PC1$ obuhvata 95,02% varijabiliteta, dok kumulativna varijansa, obuhvaćena sa prve dve komponente, iznosi 98,41%. Ovo bi se moglo objasniti prisustvom jedinjenja koja ne daju pik prilikom redukcije, a koja su prisutna u oranž tipu propolisa. Uzorci **1**, **40**, **44** i **51** se nalaze van Hotelling T^2 elipse i definisani su kao spoljne vrednosti.



Slika 32. PCA primenjena na anodne i katodne potencijale dobijene iz cikličnih voltamograma.

4.4. Određivanje fenolnog profila srpskog propolisa primenom orbitrap masene spektrometrije

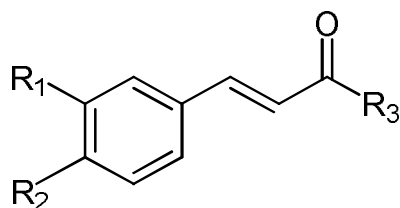
Kvalitativni i kvantitativni fenolni sastav ispitivanih uzoraka propolisa je određen primenom ultraefikasne tečne hromatografije sa orbitrap masenim analizatorom. Fenolni profil je određen poređenjem monoizotopskih masa dobijenih uz pomoć baze podataka (www.chemspider.com) ili podataka nađenih u literaturi, sa jedne strane, i masa fenola dobijenih primenom Exalibur softvera sa druge strane.

4.4.1. Identifikacija fenolnih jedinjenja

Sedamdeset pet fenolnih jedinjenja je identifikovano u ekstraktima srpskog propolisa i ekstraktima topole. Identifikovane klase fenola su fenolne kiseline, flavan-3-oli i četiri klase flavonoida: flavanoli, flavanonoli, flavanoni i flavoni, kao i njihovi derivati. Spisak identifikovanih jedinjenja sa retencionim vremenima, srednjim vrednostima monoizotopskih masa, srednjim vrednostima izračunatih masa i masenim fragmentima su navedeni u Tabeli 10. Jedinjenja identifikovana u smoli topole su posebno označena [74].

4.4.1.1. Identifikacija fenolnih kiselina i njihovih derivata

Petnaest fenolnih kiselina i njihovih derivata je identifikovano u srpskom propolisu tumačenjem dobijenih masenih spektara. Fenolne kiseline i njihovi derivati (**1-8**, **10-15**) podležu istom mehanizmu fragmentacije koji se zasniva na gubitku CO₂. Hemijske strukture fenolnih kiselina identifikovanih u propolisu su prikazane na Slici 33. Prema masenom spektru, jedinjenja **2** i **3** daju fragmente koji nastaju gubitkom molekula vode, dok jedinjenje **7** gubi CH₃ grupu [75, 76, 77]. Jedinjenje **9** daje fragment na m/z 191, koji nastaje kao rezultat raskidanja estarske veze [78]. Jedinjenje **10** sa molekulskim jonom na m/z 193,0306 odgovara izoferulinskoj kiselini i daje jon na m/z 149 [75]. Derivati kofeinske kiseline (**11-13**, **15**) daju karakteristične jone na m/z 179, nastale homolitičkim raskidanjem estarske veze, a zatim sukcesivnom dekarboksilacijom daju fragmente na m/z 135 [75]. Jedinjenje **13** daje jone na m/z 178 i 134 opisane u literaturi [76]. Jedinjenje **14** u masenom spektru ima dva karakteristična jona koja odgovaraju *p*-kumarinskoj kiselini [75].



Redni broj	Jedinjenje	R ₁	R ₂	R ₃
1	Kofeinska kiselina	OH	OH	OH
2	<i>p</i> -Kumarinska kiselina	H	OH	OH
3	Ferulinska kiselina	OCH ₃	OH	OH
4	Izoferulinska kiselina	OH	OCH ₃	OH
5	3,4-Dimetil kofeinska kiselina	OCH ₃	OCH ₃	OH
6	Cinaminska kiselina	H	H	OCH ₃
7	Prenil-estar kofeinske kiseline	OH	OH	
8	Benzil-estar kofeinske kiseline	OH	OH	
9	Feniletil-estar kofeinske kiseline	OH	OH	
10	<i>p</i> -Kumaroilkininska kiselina	OH	OH	
11	Dikofeoilkininska kiselina	OH	OH	
12	3-metilbutil-estar kumarinske kiseline	H	OH	
13	Cinamil-estar kofeinske kiseline	H	OCH ₃	

Slika 33. Hemijske strukture fenolnih kiselina derivata hidroksicinaminske kiseline identifikovane u srpskom propolisu.

4.4.2. Identifikacija flavan-3-ola

Katehin je identifikovan u ispitivanim uzorcima srpskog propolisa. Četiri potencijalna diastereoizomera katehina kao što su (+)-katehin, (-)-katehin, (+)-epikatehin i (-)-epikatehin se ne mogu razlikovati u MS spektru. Molekulski jon koji odgovara diastereoizomerima katehina je isti (m/z 289,0718) i prilikom jonizacije daju iste fragmente (dva produkt-jona na m/z 123 i m/z 159) te nije moguće bez odgovarajućeg standarda odrediti koji od stereoizomera je prisutan [80].

4.4.3. Identifikacija flavonola

Ispitivanjem masenih spektara uzoraka srpskog propolisa identifikovano je deset flavonola i njihovih derivata. Prema retroDiels Alder-ovom mehanizmu fragmentacije, u slučaju negativne jonizacije najčešće dolazi do raskidanja 1,2 i 1,3 veza. Fragmenti $[^{1,3}A]^-$ i $[^{1,2}A]^-$ najčešće nastaju ovim mehanizmom, te fenolna jedinjenja **17-21**, **23** i **26** grade karakteristične jone na m/z 179 i m/z 151, redom [79]. Jedinjenja **17**, **23** i **25** daju jon na m/z 151 koji nastaje po $[^{1,2}A-CO]^-$ mehanizmu i ima istu strukturu kao jon $[^{1,3}A]^-$, ali različit fragmentacioni put [19, 77, 79, 81]. Jedinjenja **18** i **20** imaju fragment na m/z 300 koji nastaje gubitkom CH_3 grupe [77]. Razlike između ova dva izomera potiču od položaja metil-grupe. Jon na m/z 165 potiče od $[^{1,3}A]^-$ jona, koji sadrži metil grupu u položaju 7 na A prstenu ramnetina. Izoramnetin sadrži metoksi-grupu u položaju 3 prstena B i prilikom fragmentacije daje $[^{1,3}A]^-$ na m/z 151. U slučaju bis-metilovanog kvercetina (m/z 329), dva strukturna izomera su identifikovana sa retencionim vremenima na 5,03 i 5,36 min i daju iste fragmente koji nastaju gubitkom jedne ili dve metil-grupe [77]. Maseni spektar kempferola pokazuje jone koji potiču od gubitka H_2O , CO_2 , kao i $CO-CO_2$. Kaempferid takođe gubi CH_3 i $CO-CO$ grupe, dok jedinjenje **25** gubi dve, odnosno tri CH_3 grupe. U masenom spektru jedinjenja **25** prisutni su joni na m/z 213 i 183 koji nastaju gubitkom $2CO$ i $C_3H_2O_3$ grupe, dok se fisetin fragmentiše gubeći C_2O_3 grupu i prsten B [79, 81].

4.4.4. Identifikacija flavanonola

Deset flavanonola i njihovih derivata je identifikovano u uzorcima srpskog propolisa (Tabela 10). Fragmenti $[^{1,3}\text{A}]^-$, $[^{1,3}\text{A-CO}_2]^-$ i $[^{1,3}\text{B}]^-$ su nastali prema RDA mehanizmu i identifikovani su u slučaju jedinjenja **28**, **30** i **34** [76, 77]. Karakteristični fragmenti za derivate pinobanksina (**31-36**) su na m/z 271 i m/z 253 što odgovara fragmentacionim jonima $[\text{M-acil}]^-$ i $[\text{M-acil-H}_2\text{O}]^-$. Pinobanksin i pinobanksin-3-metil etar formiraju jone koji najverovatnije potiču od gubitka H_2O , CO , $\text{H}_2\text{O}-2\text{CO}_2$ i CH_3 grupe [76, 77, 81]. Maseni spektar taksifolina (m/z 303) daje fragmente koji odgovaraju literaturnim podacima [81].

4.4.5. Identifikacija flavona

Prema MS/MS spektrima, jedinjenja **37**, **38**, **41** i **44** daju jonske vrste $[^{1,3}\text{A}]^-$, $[^{1,3}\text{B}]^-$, $[^{1,4}\text{B}+2\text{H}]^-$, $[^{1,4}\text{B}]^-$, koje nastaju RDA fragmentacionim mehanizmom. Tumačenjem masenih spektara jedinjenja **37**, **42**, **43** i **45** identifikovani su fragmenti koji potiču od gubitka CO_2 , C_2O_3 i CH_3 [77, 81]. Jedinjenje **39** daje fragmente na m/z 224 i m/z 165 koji odgovaraju literaturnim vrednostima. Maseni spektar tektokrisina (m/z 267) pokazuje fragmentacioni put opisan u literaturi [77, 78, 83].

Polimetoksiflavon sa kvazimolekulskim jonom na (m/z 371) je identifikovan kao tangeritin. Sličan fragmentacioni put je nađen u literaturi, ali primenom pozitivne jonizacije. Joni tangeritina na m/z 341, m/z 278 i m/z 247 bi mogli odgovarati gubitku 2CH_3 , 3OCH_3 , i 4OCH_3 grupa. Prema našim saznanjima, tangeritin do sada nije identifikovan u uzorcima propolisa.

4.4.6. Identifikacija flavanona

Sedam flavanona je identifikovano u masenim spektrima srpskog propolisa (**46-48**, **50-52**) koji uglavnom daju produkt jone prema 1,3 i 1,4 RDA mehanizmu, gubeći molekul vode i 2OH u slučaju likuiritigenina [37, 77, 79, 81]. Jedinjenje **49** podleže fragmentaciji prema mehanizmu opisanom u literaturi [85]. Pinostrombin i pinocembrin gube CH_3 i $\text{C}_2\text{H}_2\text{O}$ grupe dajući fragmente na m/z 254 i 165 karakteristične za jedinjenje **51** i na m/z 213 i 151 od jedinjenja **52** [77, 37]. Pinocembrin zajedno sa galanginom i krisinom se

nalazi u većoj količini u odnosu na ostala jedinjenja u evropskom propolisu topola tipa [86].

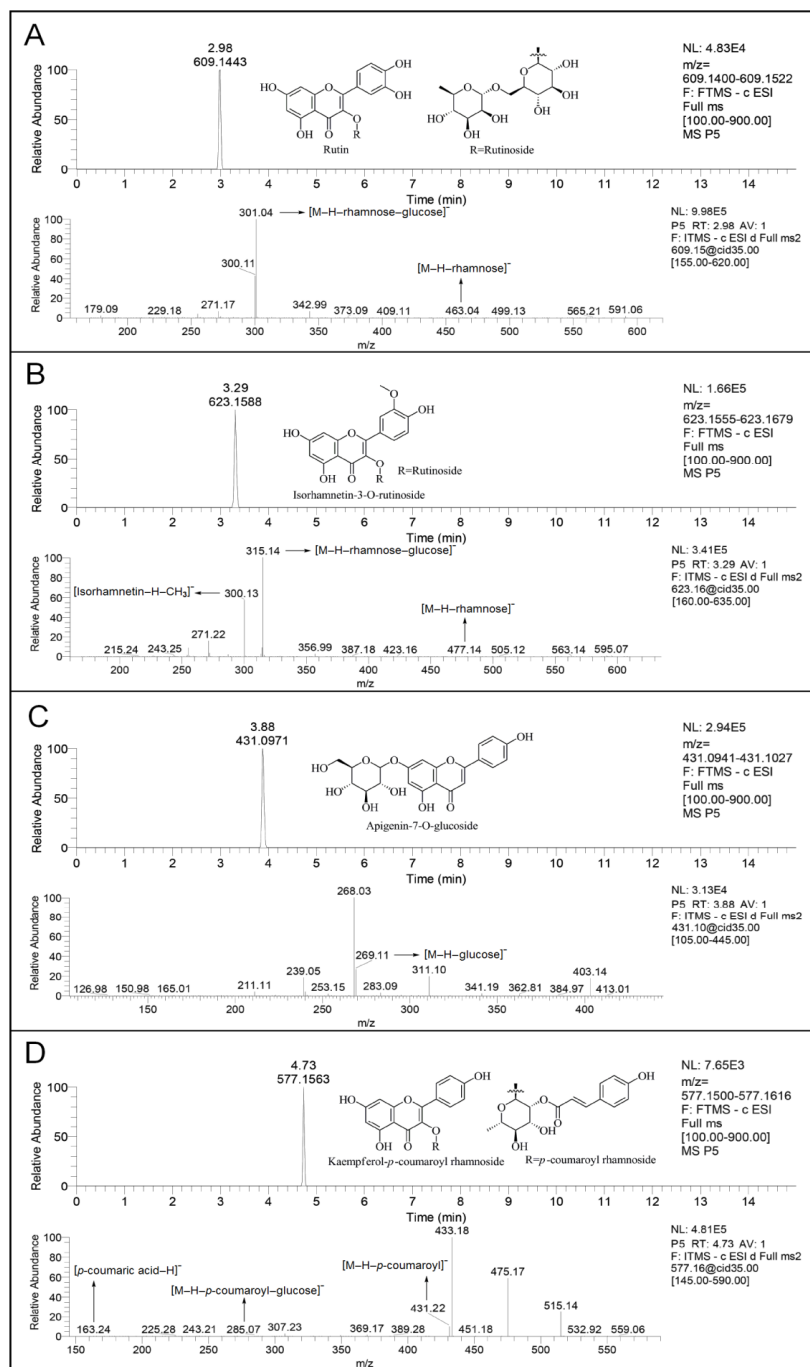
4.4.7. Identifikacija glikozida

Prema nekim autorima pčele prilikom prikupljanja propolisa mešaju enzim β -glukozidazu (koji ulazi u sastav pčelinje pljuvačke) sa pčelinjim voskom i na taj način razlažu glikozide na šećernu jedinicu i fenol. Iz tih razloga se dugo smatralo da propolis ne sadrži glikozide. Uprkos tome, visokosofisticirane analitičke metode su potvrdile prisustvo glikozida u propolisu. Prema dosadašnjim studijama glikozidi su identifikovani u propolisu iz Portugalije, Krita, Azije, Severne Amerike i Evrope [19, 87].

Četiri glikozida su identifikovana u srpskom propolisu (**53-56**). Ovi glikozidi se fragmentišu raskidanjem glikozidne veze sa vodoničnim premeštanjem, pri čemu se eliminiše monosaharidni ostatak. Rutin (kvercetin-3-*O*-rutinozid, m/z 609) je identifikovan u uzorcima koji pripadaju plavom tipu propolisa. Rutin je do sada identifikovan u evropskom, azijskom i severnoameričkom propolisu [87]. Pikovi na m/z 300 i m/z 301, koji potiču od fragmenata rutina, su saglasni literaturnim vrednostima [19]. Izoramnetin-3-*O*-rutinozid (m/z 623) je identifikovan u oba tipa propolisa, a fragmenti na m/z 313 i m/z 300 nastaju raskidanjem glikozidne veze i gubitkom rutinozne jedinice i rutinozida-CH₃. Ovo jedinjenje je identifikovano u kritskom propolisu [19, 87].

Kempferol-*p*-kumaroil-ramnozid (m/z 377) je identifikovan u portugalskom propolisu i podleže fragmentacionom mehanizmu slično kempferolu [19]. Na Slici 34 prikazan je hromatogram sa srednjim vrednostima retencionih vremena, tačnim masama, strukturama i MS/MS spektrima za četiri glikozida nađena u etanolnim ekstraktima propolisa.

Prema našem saznanju, apigetrin (apigenin-7-*O*-glikozid, m/z 431) je prvi put identifikovan u ekstraktima propolisa. Maseni spektar sadrži dva fragmenta, na m/z 269 (koji potiče od [M-H-glukoza]⁺ fragmentacije) i od jona na m/z 151 ([^{1,4}B+2H]⁺). Fragmentacioni put jedinjenja **55** je u saglasnosti sa literaturom. Aromatično bilje kao što je *Lamiaceae spp.* (ruzmarin, origano, žalfija, bosiljak, majčina dušica) sadrži ovaj glikozid [88].



Slika 34. Maseni spektri glikozida identifikovanih u srpskom propolisu.

4.4.8. Identifikacija fenolnih glicerida

Fenolni gliceridi su identifikovani u propolisu iz Rusije, Bugarske, Švajcarske, Turske i Nemačke. Ova jedinjenja najverovatnije potiču od hibrida topole kao što su *Poplar sp.* i *Apsen sp.* Evroazijski propolis uglavnom potiče od gore navedenih vrsta topole. i sadrži nekoliko fenil-propenoid-glikozida [72, 86, 89].

Na osnovu masenih spektara ispitivanih uzoraka propolisa nađeno je dvanaest fenolnih glicerida (jedinjenja **57-68**). Prema našim saznanjima, kofeoil-glicerid (m/z 253), trikumaroil-glicerid (m/z 529), dva izomera kumaroil feruiloil-glicerid (m/z 413), dikofeoil kumaroil-glicerid (m/z 561) i dikofeoil feruiloil-glicerid (m/z 457), su identifikovani prvi put u uzorcima propolisa. Šest jedinjenja **58**, **59**, **61**, **63**, **65** i **66** je identifikovano u etanolnim ekstraktima evropskog propolisa [86, 89, 90]. Jedinjenje **57** gradi fragment na m/z 179 koji bi mogao poticati od kofeinske kiseline, što je u saglasnosti sa literaturom [82]. Dva izomera kumaroil feruloil-gliceroid sa istim fragmentacionim putevima razlikuju se prema retencionim vremenima [91]. Jedinjenja **58**, **63**, **67** i **68** imaju iste fragmente na m/z 179 i m/z 161 koji potiču od fragmentacije *p*-kumarinske, kofeinske i ferulinske kiseline. Jedinjenja **63**, **65** i **66** su identifikovana u plavom tipu nemačkog propolisa i *Populus tremula* hibridu topole, kao potencijalnom botaničkom izvoru. Izabrani jon hromatogram sa retencionim vremenima i tačnim masama fenolnih glicerida su prikazani na Slici 35, zajedno sa dva derivata kumaroil-feruiloil-glicerid i dikaferuiloil-acetil-glicerid (m/z 457) [72].

Tabela 10. Fenolna jedinjenja identifikovana u propolisu UHPLC- LTQ OrbiTrap MS/MS.

Broj pika	Identifikovana jedinjenja	t_R (min)	Izračunata masa, $[M-H]^-$	Nadena masa, $[M-H]^-$	Greška (mDa)	Fragmentacija	Reference
Fenolne kiseline i derivati							
1	Galna kiselina ^{a,b,c}	0.55	169.0147	169.0135	1.2	125 $[M-H-CO_2]^-$	[77]
2	Protocatehinska kiselina ^{a,b,c,d}	1.10	153.0197	153.0188	0.9	135 $[M-H-H_2O]^-$, 109 $[M-H-CO_2]^-$	[77]
3	Kofeinska kiselina ^{a,b,c}	2.18	179.0350	179.0345	0.5	161 $[M-H-H_2O]^-$, 135 $[M-H-CO_2]^-$	[77]
4	<i>p</i> -Koumarinska kiselina ^{a,b}	2.66	163.0401	163.0395	0.6	119 $[M-H-CO_2]^-$	[77]
5	Cinaminska kiselina ^{a,c}	3.26	147.0452	147.0447	0.5	103 $[M-H-CO_2]^-$	[77]
6	Dikofeoil kininska kiselina ^c	3.33	515.1195	515.1179	1.6	179 $[C_9H_7O_4]^-$, 161 $[C_9H_7O_4-H_2O]^-$, 135 $[C_9H_7O_4-CO_2]^-$	[75, 77]
7	Ferulinska kiselina ^{a,c, d}	3.71	193.0506	193.0495	1.1	178 $[M-H-CH_3]^-$, 149 $[M-H-CO_2]^-$	[76]
8	3,4-Dimetil kofeoil ^{c,d}	4.43	207.0663	207.0656	0.7	179 $[M-H-2CH_3]^-$, 163 $[M-H-CO_2]^-$	[77]
9	<i>p</i> -Koumaroil kininska kiselina ^c	4.56	337.0929	337.0912	1.7	191 $[C_7H_{11}O_6]^-$	[78]
10	Izoferulinska kiselina ^{a,c}	5.28	193.0506	193.0500	0.6	149 $[M-H-CO_2]^-$	[77]
11	Prenil kofeat ^c	5.88	247.0976	247.0972	0.4	179 $[C_9H_7O_4]^-$, 135 $[C_9H_7O_4-CO_2]^-$	[37]
12	Feniletar kofeinske kiseline (CAPE) ^{a,c}	6.12	283.0976	283.0970	0.6	179 $[C_9H_7O_4]^-$, 135 $[C_9H_7O_4-CO_2]^-$	[77]
13	Cinamil-estar kofeinske kiseline ^{a,c}	6.51	295.0976	295.0966	1.0	178 $[C_9H_6O_4-H]^-$, 134 $[C_9H_6O_4-H-CO_2]^-$	[76]
14	Metil butenil-estar <i>p</i> -kumarinske kiseline ^c	6.54	231.1020	231.1022	-0.2	163 $[C_9H_7O_3]^-$, 119 $[M-H-CO_2]^-$	[77]
15	Benzil kofeat ^{a,c}	6.72	269.0819	269.0811	0.8	179 $[C_9H_7O_4]^-$, 135 $[C_9H_7O_4-CO_2]^-$	[77]
Flavan-3-oli							
16	Katehin or epikatehin ^{a,c}	1.80	289.0718	289.0716	0.2	123, 159	[80]
Flavonoli							
17	Kvercetin ^{a,b,c}	4.13	301.0354	301.0352	0.2	179 $[^{12}A]^-$, 151 $[^{12}A-CO]^-$, 121 $[^{12}B]^-$	[79]
18	Ramnetin ^{a,c}	4.36	315.0510	315.0501	0.9	300 $[M-H-CH_3]^-$, 165 $[^{13}A]^-$	[77]
19	Kempferol ^{b,c}	4.70	285.0405	285.0395	1.0	267 $[M-H-H_2O]^-$, 241 $[M-H-CO_2]^-$, 199 $[M-H-C_2H_2O-CO_2]^-$, 151 $[^{13}A]^-$	[79, 81]
20	Izoramnetin ^{a,c}	4.80	315.0510	315.0500	1.0	300 $[M-H-CH_3]^-$, 151 $[^{13}A]^-$	[77]
21	Kaempferid ^{a,c}	4.91	299.0561	299.0551	1.0	284 $[M-H-CH_3]^-$, 243 $[M-H-2CO]^-$, 151 $[^{13}A]^-$	[79]
22	Bis-metilovani kvercetin ^{a,c}	5.03	329.0667	329.0659	0.8	315 $[M-CH_3]^-$	[77]

23	Kvercetin tetrametil etar ^{a,c,d}	5.44	357.0980	357.0968	1.2	327 [M–H–2CH ₃] [–] , 312 [M–H–3CH ₃] [–] , 179 [^{1,2} A] [–] , 151 [^{1,2} A–CO] [–]	[19]
24	Bis-metilovani kvercetin ^{a,c}	5.56	329.0667	329.0654	1.3	315 [M–CH ₃] [–]	[77]
25	Galangin ^{a,b,c}	5.97	269.0456	269.0455	0.1	213 [M–H–C ₂ O ₂] [–] , 183 [M–H–C ₂ H ₂ O–CO ₂] [–] , 151 [^{1,2} A–CO] [–]	[77, 79]
26	Fisetin ^c	5.98	285.0405	285.0399	0.6	213 [M–H–CO ₂ –CO] [–] , 177 [M–H–prsten B] [–] , 163 [^{1,2} A] [–] , 135 [^{1,2} A–CO] [–]	[79]
Flavanonoli							
27	Taksiifolin ^{a,c}	3.04	303.0510	303.0500	1.0	285, 177, 125	[82]
28	Pinobanksin ^{a,c}	4.71	271.0612	271.0612	0.0	253 [M–H–H ₂ O] [–] , 243 [M–H–CO] [–] , 165 [M–H–H ₂ O–2CO ₂] [–] , 151 [^{1,3} A] [–]	[76, 77]
29	Pinobanksin-5-metil-etar-3- <i>O</i> -acetat ^c	6.65	327.0870	327.0864	0.6	285 [M–acetat] [–] , 165 [M–H–acetat–H ₂ O–2CO ₂] [–]	[77]
30	Pinobanksin-5-metil-etar ^{a,c}	6.03	285.0767	285.0759	0.8	271 [M–CH ₃] [–] , 252 [M–CH ₃ –H ₂ O] [–] , 239 [M–H–H ₂ O–CO] [–] , 224 [M–H–H ₂ O–CH ₃ –CO] [–] , 195 [M–H–H ₂ O–CO–CO ₂] [–] , 165 [^{1,3} A] [–]	[76, 77]
31	Pinobanksin-3- <i>O</i> -acetat ^c	6.08	313.0712	313.0707	0.5	271 [M–acetat] [–] , 253 [M–acetat–H ₂ O] [–]	[77]
32	Pinobanksin-3- <i>O</i> -propionat ^c	6.66	327.0869	327.0864	0.5	271 [M–propionat] [–] , 253 [M–propionat–H ₂ O] [–]	[77]
33	Pinobanksin-3- <i>O</i> -butirat (ili izomer) ^c	7.17	341.1002	341.1019	-1.7	271 [M–butirat] [–] , 253 [M–butirat–H ₂ O] [–]	[77]
34	Pinobanksin-3- <i>O</i> -pentanoat (ili isomer) ^c	7.21	353.1026	353.1022	0.4	271 [M–pentanoat] [–] , 253 [M–pentanoat–H ₂ O] [–] , 107 [^{1,3} A–CO ₂] [–] , 101 [^{1,3} B] [–]	[76, 77]
35	Pinobanksin-3- <i>O</i> -pentanoat (ili isomer) ^c	7.64	355.1183	355.1176	0.7	271 [M–pentanoat] [–] , 253 [M–pentanoat–H ₂ O] [–]	[77]
36	Pinobanksin-3- <i>O</i> -heksanoat (ili isomer) ^c	8.07	369.1339	369.1332	0.7	271 [M–hexaonat] [–] , 253 [M–hexaonat–H ₂ O] [–]	[77]
Flavoni							
37	Luteolin ^{b,c}	4.14	285.0405	285.0396	0.9	151 [^{1,3} A] [–] , 213 [M–H–CO ₂ –CO] [–]	[77]
38	Apigenin ^{b,c}	4.62	269.0456	269.0446	1.0	151 [^{1,4} B+2H] [–] , 149 [^{1,4} B] [–] , 117 [^{1,3} B] [–]	[83, 77]
39	Tektokrisin ^c	4.77	267.0663	267.0656	0.7	224, 165	[37, 77]
40	Tangeritin ^{c,d}	4.98	371.1136	371.1122	1.4	341 [M–H–2CH ₃] [–] , 278 [M–H–3OCH ₃] [–] , 247 [M–H–4OCH ₃] [–]	[84]
41	Acacetin ^{b,c}	5.32	283.0612	283.0602	1.0	151 [^{1,3} A] [–] , 107 [^{1,3} A–CO ₂] [–]	[77]
42	Krisin ^{a,c}	5.80	253.0506	253.0502	0.4	209 [M–H–CO ₂] [–] , 181 [M–H–CO ₂ –CO] [–] , 143 [M–H–C ₃ O ₂ –C ₂ H ₂ O] [–]	[76]
43	Metoksi-krisin ^{a,c}	5.82	283.0612	283.0603	0.9	268 [M–H–CH ₃] [–] , 239 [M–H–CO ₂] [–] , 211 [M–H–CO ₂ –CO] [–]	[77]
44	Dihidroksi flavon ^c	6.08	253.0506	253.0500	0.6	117 [^{1,3} B] [–]	[77]
45	Hidroksidimetoksi flavon ^c	6.17	297.0767	297.0759	0.8	254 [M–H–CH ₃ –CO] [–]	[81, 83]
Flavanoni							
46	Eriodiktio ^c	3.51	287.0561	287.0555	0.6	135 [^{1,3} B] [–] , 125 [^{1,4} A] [–]	[77]
47	Sakuranetin ^c	4.36	285.0769	285.0757	1.2	165 [C ₈ H ₅ O ₄] [–] , 119	[37, 77]

48	Naringenin ^{a,c}	4.58	271.0612	271.0601	1.1	151 [^{1,3} B] ⁻ , 119 [^{1,3} A] ⁻	[79]
49	Hesperetin ^c	4.79	301.0718	301.0706	1.2	173, 163, 135, 133	[85]
50	Likuiritigenin ^c	5.82	255.0663	255.0652	1.1	153 [^{1,3} A] ⁻ , 135 [^{1,3} A-H ₂ O] ⁻ , 119 [^{1,3} A-OH-OH] ⁻	[81]
51	Pinostrobin ^{a,c}	5.86	269.0819	269.0813	0.6	254 [M-H-CH ₃], 165 [^{1,3} A] ⁻	[77]
52	Pinocembrin ^{a,b,c}	5.92	255.0663	255.0658	0.5	213 [M-H-C ₂ H ₂ O] ⁻ , 151 [^{1,3} A] ⁻	[77]
Glikozidi							
53	Rutin ^b	2.98	609.1461	609.1443	1.8	301 [M-H-rutinozid] ⁻	[77]
54	Izoramnetin-3- <i>O</i> -rutinozid ^c	3.29	623.1617	623.1588	2.9	315 [M-H-rutinozid] ⁻ , 300 [M-H-rutinozid-CH ₃] ⁻	[19]
55	Apigetrin (Apigenin-7- <i>O</i> -glikozid) ^{c,d}	3.88	431.0984	431.0971	1.3	269 [M-H-glukozid] ⁻ , 151 [^{1,4} B+2H] ⁻	[88]
56	Kempferol- <i>p</i> -kumaroil ramnozid ^c	4.73	577.1558	577.1563	-0.5	431, 285 [M-H-kumaroil-ramnosid] ⁻ , 151	[19]
Fenolni gliceridi							
57	Kofeoil glicerol ^c	2.35	253.0710	253.0714	-0.4	179 [C ₉ H ₇ O ₄] ⁻	[82]
58	Kofeoilkumaroilacetyl-glicerid ^d	3.38	441.1622	441.1628	-0.6	381, 179 [C ₉ H ₇ O ₄] ⁻ , 161 [C ₉ H ₇ O ₄ -H ₂ O] ⁻	
59	Kumaroil acetyl-glicerid ^d	3.83	279.0860	279.0865	-0.5	253, 225, 207, , 163 [C ₉ H ₇ O ₃] ⁻	
60	Trikumaroil-glicerid ^d	3.93	529.1483	529.1470	1.3	163 [C ₉ H ₇ O ₃] ⁻	
61	Kumaroilkofeoil-glicerid ^c	4.42	399.1068	399.1067	0.1	253, 235, 163 [C ₉ H ₇ O ₃] ⁻ , 145	[82]
62	Kumaroilferuloil glicerid ^c	4.91	413.1212	413.1231	-1.9	235, 193 [C ₁₀ H ₉ O ₄] ⁻ , 163 [C ₉ H ₇ O ₃] ⁻	[91]
63	Dikofeoil acetyl glicerid ^{a,d,c}	4.95	457.1122	457.1130	-0.8	397, 383, 299, 235, 179 [C ₉ H ₇ O ₄] ⁻ , 161 [C ₉ H ₇ O ₄ -H ₂ O] ⁻ , 135	[72]
64	Kumaroilferuloil glicerid ^c	5.05	413.1212	413.1230	-1.8	235, 193 [C ₁₀ H ₉ O ₄] ⁻ , 163 [C ₉ H ₇ O ₃] ⁻	[91]
65	Kumaroilkofeoil acetyl -glicerid ^{a,c,d}	5.36	441.1173	441.1180	-0.7	295, 235, 161 [C ₉ H ₇ O ₄ -H ₂ O] ⁻ , 135	[72]
66	Dikumaroilacetyl-glicerid ^{a,c,d}	5.80	425.1224	425.1234	-1.0	321, 215, 163 [C ₉ H ₇ O ₃] ⁻	[72]
67	Dikofeoil kumaroil-glicerid ^d	6.23	561.1854	561.1898	-4.4	179 [C ₉ H ₇ O ₄] ⁻ , 163, 161 [C ₉ H ₇ O ₄ -H ₂ O] ⁻	
68	Dikofeoilferuloil -glicerid ^d	6.40	591.1508	591.1539	-3.1	193, 179 [C ₉ H ₇ O ₄] ⁻ , 161 [C ₉ H ₇ O ₄ -H ₂ O] ⁻ , 135	
Derivat kofeinske kiseline							
69	Derivat kofeinske kiseline ^d	8.55		579.3369		505, 363, 281, 179 [C ₉ H ₇ O ₄] ⁻ , 161 [C ₉ H ₇ O ₄ -H ₂ O] ⁻ , 135 [C ₉ H ₇ O ₄ -CO ₂] ⁻	
70	Derivat kofeinske kiseline ^d	8.71		353.1990		193 [C ₉ H ₇ O ₂] ⁻ , 179 [C ₉ H ₇ O ₄] ⁻ , 161 [C ₉ H ₇ O ₄ -H ₂ O] ⁻ , 143	
71	Derivat kofeinske kiseline ^d	9.29		481.3294		461, 225, 179 [C ₉ H ₇ O ₄] ⁻ , 135 [C ₉ H ₇ O ₄ -CO ₂] ⁻	
72	Derivat kofeinske kiseline ^d	9.46		607.3683		465, 281, 225, 179 [C ₉ H ₇ O ₄] ⁻ , 135 [C ₉ H ₇ O ₄ -CO ₂] ⁻	
73	Derivat kofeinske kiseline ^d	9.69		583.3606		253, 225, 179 [C ₉ H ₇ O ₄] ⁻ , 135 [C ₉ H ₇ O ₄ -CO ₂] ⁻	

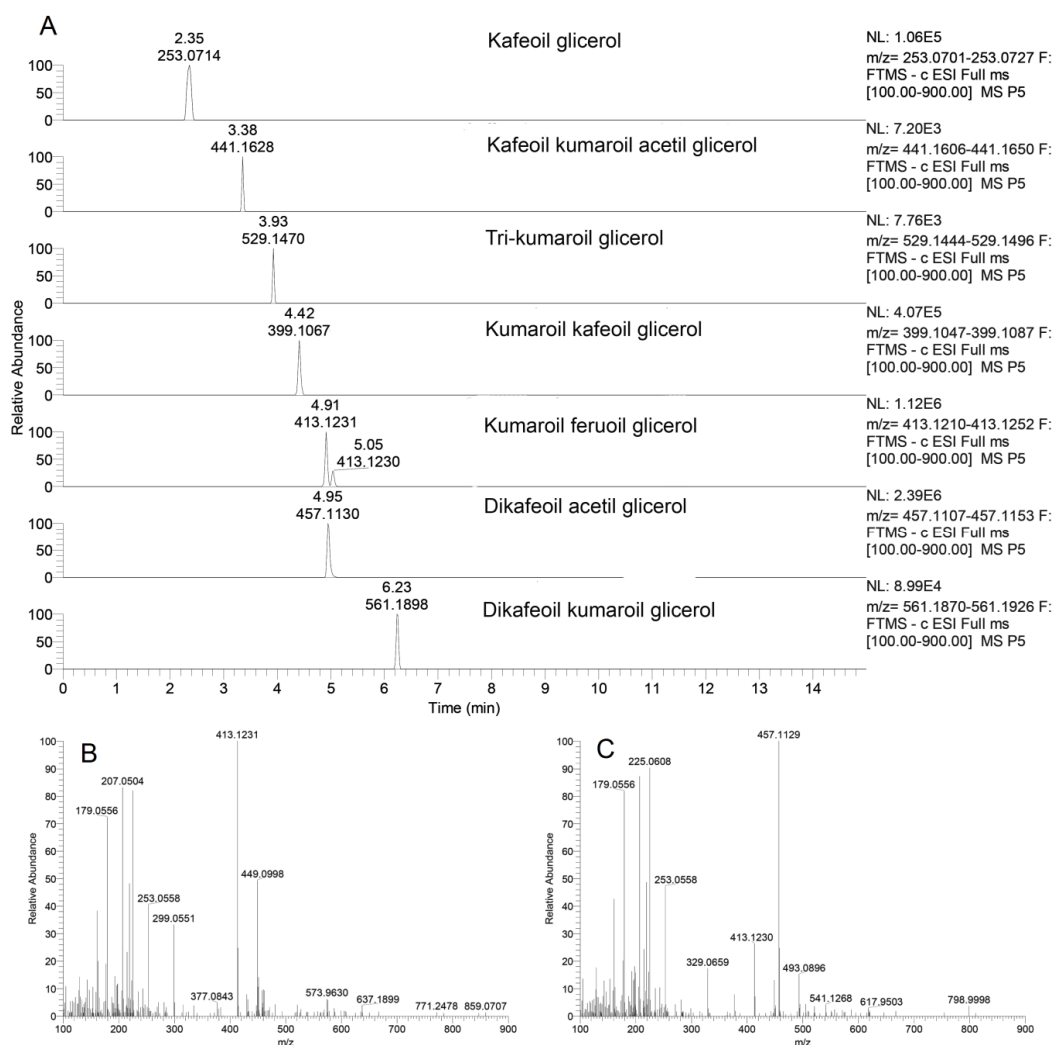
74	Derivat kofeinske kiseline ^d	9.99	639.3505	460, 299, 225, 179 [C ₉ H ₇ O ₄] ⁻ , 135 [C ₉ H ₇ O ₄ -CO ₂] ⁻
75	Derivat kofeinske kiseline ^d	10.36	647.4361	578, 543, 253, 225, 161 [C ₉ H ₇ O ₄ -H ₂ O] ⁻ , 135 [C ₉ H ₇ O ₄ -CO ₂] ⁻
Neidentifikovana jedinjenja				
76	Neidentifikovano jedinjenje 1 ^d	9.86	533.3683	523, 313, 253, 225
77	Neidentifikovano jedinjenje 2 ^d	11.37	683.4415	418, 281, 225, 207

^aJedinjenja nađena u smoli pupoljka topole.

^bU saglasnosti sa standardnim jedinjenjem.

^cU saglasnosti sa referencom.

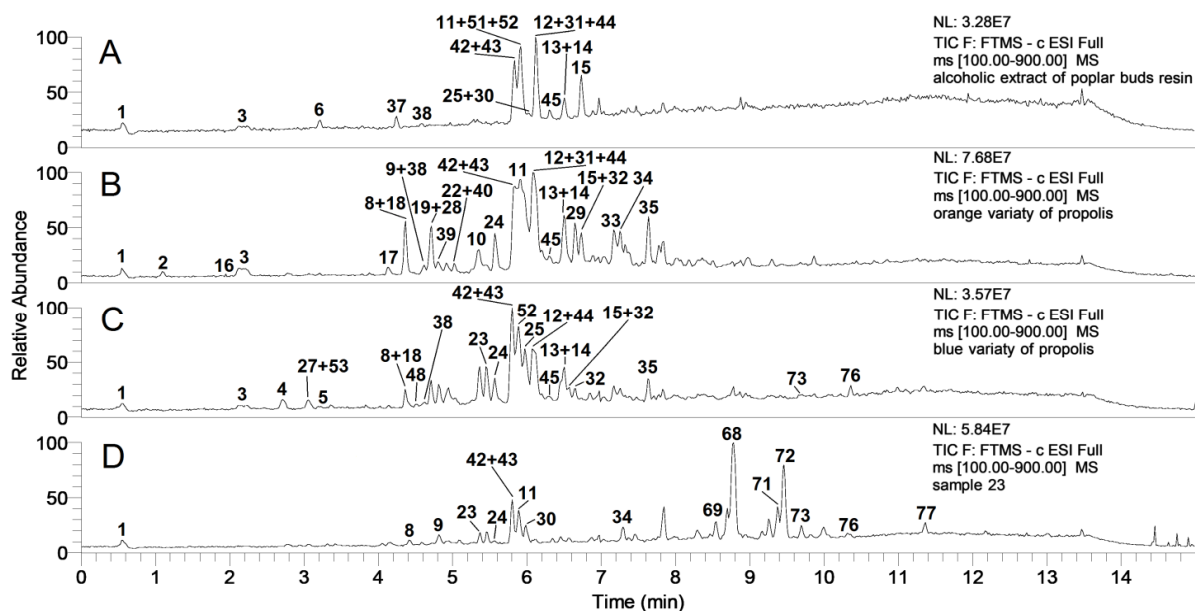
^dU saglasnosti sa masenoi fragmentaciji.



Slika 35. Maseni sprektiri fenol glicerida identifikovanih u srpskom propolisu.

4.4.9. Identifikacija derivata kafeinske kiseline i neidentifikovana jedinjenja

Prema masenoj fragmentaciji jedinjenja **69-75** su potencijalno identifikovani kao derivati kafeinske kiseline sa fragmentima na m/z 179, 161 i 135. Neidentifikovana jedinjenja (**76** i **77**) sa retencionim vremenima 9,86 i 11,37 min su karakteristična za plavi tip propolisa. Jedinjenja **70**, **72**, **73** i **77** su prisutna u uzorcima **15**, **23** i **48** koji pokazuju drugačiji fenolni profil od ostalih (Slika 36 D) [65]. Prema HPTLC studiji, ovi uzorci predstavljaju podgrupu plavog tipa propolisa. Ukupni jonski hromatogram oba tipa propolisa kao i smole pupoljaka topole su prikazani na Slici 36 [74].



Slika 36. TIC hromatogram propolisa i smola pupoljaka topole.

Jedinjenja karakteristična za oba tipa propolisa su galna kiselina, kafeinska kiselina, pinobanksin, pinobanksin-3-*O*-pentanoat, pinobanksin-3-*O*-acetat, pinobanksin-3-*O*-heksanoat, krisin, CAPE i pinocembrin (Slika 36). U Tabeli 11 su prikazana jedinjenja karakteristična za oba tipa propolisa i ekstrakt pupoljaka topole [74]. Slični rezultati su dobijeni za hemijski sastav pupoljka topole od strane Bankove [86]. Ukupni hromatogram oranž i plavog tipa propolisa kao i smole topole je prikazan na Slici 36. Može se uočiti

sličnost između uzorka koji pripada oranž tipu propolisa i smole topole, dok plavi tip propolisa ima manje fenolnih jedinjenja.

Tabela 11. Fenolna jedinjenja karakteristična za oba tipa propolisa i smolu topole

Broj	Oranž tip	Plavi tip	Smola topole
1	Benzil kofeat	Benzil kofeat	Benzil kofeat
2	Protokatehinska kiselina	<i>p</i> -Kumarinska kiselina	Galna kiselina
3	CAPE	CAPE	CAPE
4	Dihidroflavon krisin	Cinaminska kiselina	Kofeinska kiselina
3	Tektokrisin	Pinocembrin	Pinocembrin
6	Tangeritin	Taksifolin	Krisin
7	<i>Bis</i> -metilovani kvercetin	Kvercetin tetrametil etar	Cinamil estar kofeinske kiseline
8	Apigenin	Dihidroksiflavon	Apigenin
9	Kaempferol	Derivat kofeinske kiseline	Pinostrobin
10	Ramnetin	Naringenin	Pinobanksin-3-metiletar
11	Pinobanksin	Kvercetin-3- <i>O</i> -rutinozid	Galangin
12	Pinobanksin-3- <i>O</i> -acetat	Galangin	Ponobanksin-3- <i>O</i> -acetat
13	Pinobanksin-3- <i>O</i> -propionat	Pinobanksin-3- <i>O</i> -propionat	
14	Pinobanksin-3- <i>O</i> -butirat		
13	Pinobanksin-3- <i>O</i> -pentanoat		

Sličan profil je dobijen u slučaju nemačkog propolisa [72, 73]. Fenolni profil nemačkog propolisa ispitivan DART, TLC i TLC-MS metodom pokazuje da jedinjenja kao što su kumarinska kiselina, galangin, naringenin, kofeinska kiselina, krisin i metoksiflavanon ili njegov izomer i benzil kofeat ili pinostrobin pripadaju plavom tipu propolisa, dok oranž tip karakterišu fenolna jedinjenja kao što su kempferol, pinobanksin, galangin, apigenin i kvercetin dimetil-etar. Jedinjenja kao što su CAPE, kumarinska kiselina, kvercetin i krisin prisutna su u oba tipa propolisa, ali u znatno manjoj količini u plavom tipu [72, 73].

Tri uzorka (**13**, **23**, **48**) pokazuju različit hromatografski profil prema HPTLC metodi. Ovi uzorci ne sadrže intenzivne pikove na TIC hromatogramu koji odgovaraju galanginu, krisinu, CAPE i pinobanksin-3-*O*-acetatu. U uzorku **23** su identifikovani derivati kofeinske kiseline i kumaroil kofeoil acetil glicerol. Prema HPTLC profilu, ovi uzorci su podgrupa plavog propolisa i oni najverovatnije ne potiču od topole, već iz drugih botaničkih izvora i mogu biti predmet nekih narednih istraživanja [65].

4.4.10. Kvantitativna analiza fenolnih jedinjenja u uzorcima propolisa

Deset fenolnih jedinjenja je kvantifikovano u uzorcima propolisa. Koncentracije kvantifikovanih fenola su date u Tabeli 12, zajedno sa srednjim vrednostima, korelacionim koeficientima, granicom detekcije, granicom kvantifikacije, povratnim prinosom na tri nivoa koncentracije.

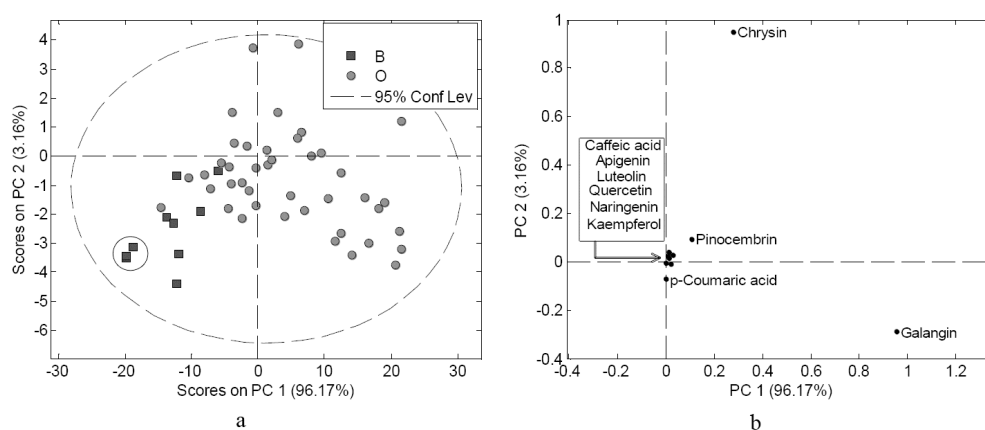
Prema Tabeli 12 moguće je uočiti razlike između dva tipa propolisa. Najviše fenolnih jedinjenja je kvantifikovano u uzorcima koji pripadaju oranž tipu propolisa. Najzastupljenije komponente u oranž tipu propolisa su pinocembrin, galangin i krisin. Naringenin nije kvantifikovan u oranž, ali je nađen u uzorcima koji pripadaju plavom tipu propolisa. Prema Bankovoj, pinocembrin, galangin i krisin su najzastupljenija fenolna jedinjenja u evropskom propolisu, što je u saglasnosti sa dobijenim rezultatima za srpski propolis [86]. U uzorcima **15**, **23**, **48** nisu kvantifikovani svi fenoli, ili je njihova koncentracija ispod granice detekcije. Maseni spektar uzorka **23** pokazuje pik koji odgovara naringinu.

Tabela 12. Sadržaj kvantifikovanih fenola u oranž i plavom tipu propolisa. Naziv jedinjenja, korelacioni koeficijent, granica detekcije (*LOD*), granica kvantifikacije (*LOQ*), povratni prinos, odsečak i nagib kalibracione krive i koncentracioni opseg.

Br,	Jedinjenja	R^2	<i>LOD</i> (mg/g)	<i>LOQ</i> (mg/g)	Povratni prinos, %			Odsečak	Nagib	Koncentracioni opseg (mg/g)	
					Nivo 1	Nivo 2	Nivo 3			Plavi tip	Oranž tip
1	Kofeinska kiselina	0,9948	0,09	0,29	109	102	101	$-7,93 \cdot 10^5$	$2,72 \cdot 10^7$	LOD – 1,08	0,26 – 2,80
2	<i>p</i> -Kumarinska kiselina	0,9918	0,1	0,36	107	93	100	$2,55 \cdot 10^5$	$2,69 \cdot 10^6$	LOD – 1,17	LOD – 2,35
3	Luteolin	0,9938	0,1	0,33	98	98	95	$6,55 \cdot 10^5$	$3,82 \cdot 10^7$	LOD- 0,16	LOD – 0,57
4	Kvercetin	0,9930	0,1	0,34	98	89	94	$-6,91 \cdot 10^5$	$1,55 \cdot 10^7$	LOD -0,20	LOD – 0,64
5	Apigenin	0,9959	0,08	0,27	100	93	99	$6,23 \cdot 10^5$	$3,99 \cdot 10^7$	LOD – 0,51	0,10 – 0,95
6	Naringenin	0,9931	0,09	0,32	106	103	107	$-8,34 \cdot 10^5$	$2,88 \cdot 10^8$	LOD – 0,14	<LOD
7	Kempferol	0,9979	0,05	0,19	94	107	95	$-3,27 \cdot 10^5$	$3,45 \cdot 10^7$	LOD – 0,75	0,48 – 1,32
8	Pinocembrin	0,9790	0,12	0,4	98	98	103	$8,04 \cdot 10^6$	$7,73 \cdot 10^7$	LOD – 3,49	0,81 – 8,91
9	Krisin	0,9904	0,19	0,62	101	104	102	$1,13 \cdot 10^6$	$5,20 \cdot 10^6$	LOD – 6,99	1,39 – 16,84
10	Galangin	0,9982	0,05	0,16	109	85	110	$-3,51 \cdot 10^5$	$1,18 \cdot 10^8$	0,17 – 14,30	4,48 – 41,20

4.4.11. Multivarijantna analiza sprskog propolisa na osnovu sadržaja fenola

PCA je primenjena u cilju pronalaženja sličnosti i razlika između ispitivanih uzoraka, tj. postojanja dva tipa propolisa. Kvantifikovane količine fenola su korišćene kao varijable. PCA primenjena na autoskalirane vrednosti rezultuje četvorokomponentnim modelom kojim se objašnjava 99.91% od ukupnog varijabiliteta. Prva glavna komponenta obuhvata 96,17%, a druga 3,16% od ukupnog varijabiliteta. Zajednička projekcija skorova i njihovih latentnih varijabli za prve dve komponente su prikazane na Slici 37. Uzajamne projekcije skorova za prve dve komponente pokazuju prisustvo dva tipa propolisa. Ove dve grupe odgovaraju klasifikaciji prema HPTLC profilu. Idući od negativnih ka pozitivnim vrednostima $PC1$, uzorci su razdvojeni na dve grupe. Uzorci **15**, **23**, i **48** formiraju posebnu grupu, što se može objasniti na osnovu predhodno opisanih svojstava ova tri uzorka [74].



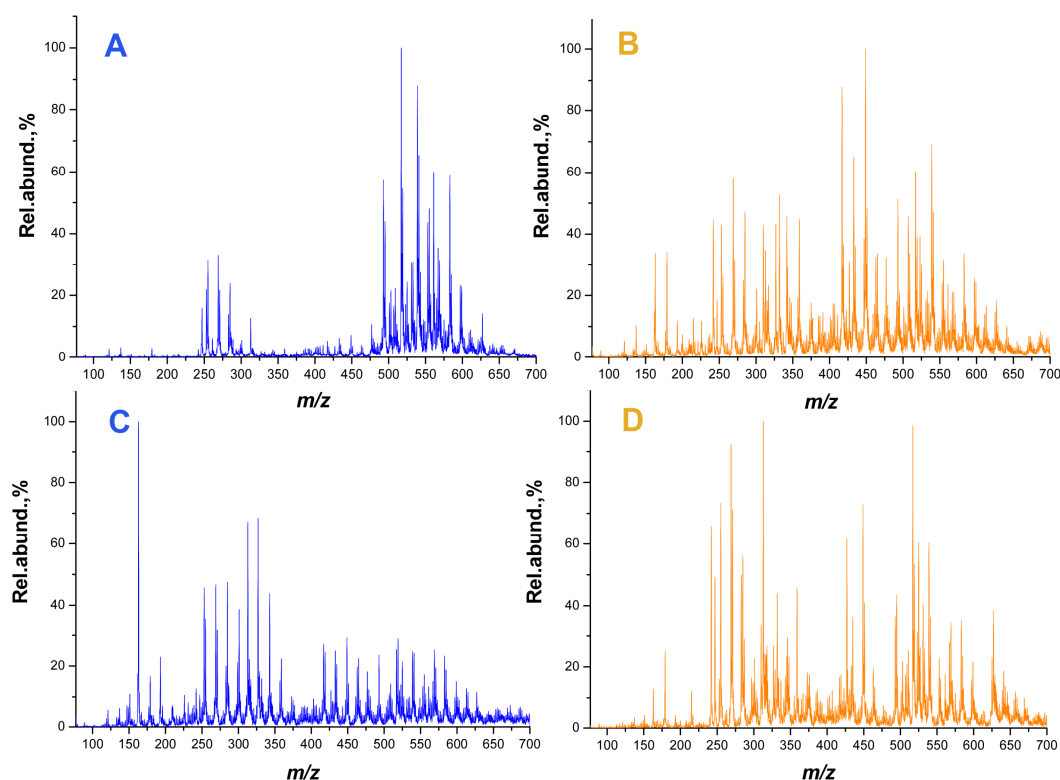
Slika 37. PCA propolisa na osnovu kvantifikovanih fenola u srpskom propolisu

Grafik latentnih varijabli ukazuje na uticaj pojedinih fenolnih jedinjenja na razdvajanje. Galangin zajedno sa CAPE, krisinom i pinocembrinom pokazuje najveći uticaj na razdvajanje. Galangin pokazuje najveći uticaj na $PC1$, dok je krisin pozitivno korelisan sa $PC2$. Gore navedeni fenoli predstavljaju karakteristične markere propolisa oranž tipa [74].

4.4.12. Multivarijantna analiza nemačkog propolisa zasnovana na DART

Temperature od 150 °C i 300 °C su korišćene za ambijentalnu masenu spektroskopiju, DART. Maseni spektri snimani na dve različite temperature od 150 °C i 300 °C su preliminarno ispitivani na osam uzoraka plavog i osam uzoraka oranž tipa propolisa. Maseni spektri snimani na 150 °C daju manji intenzitet signala i relativno visoku pozadinu.

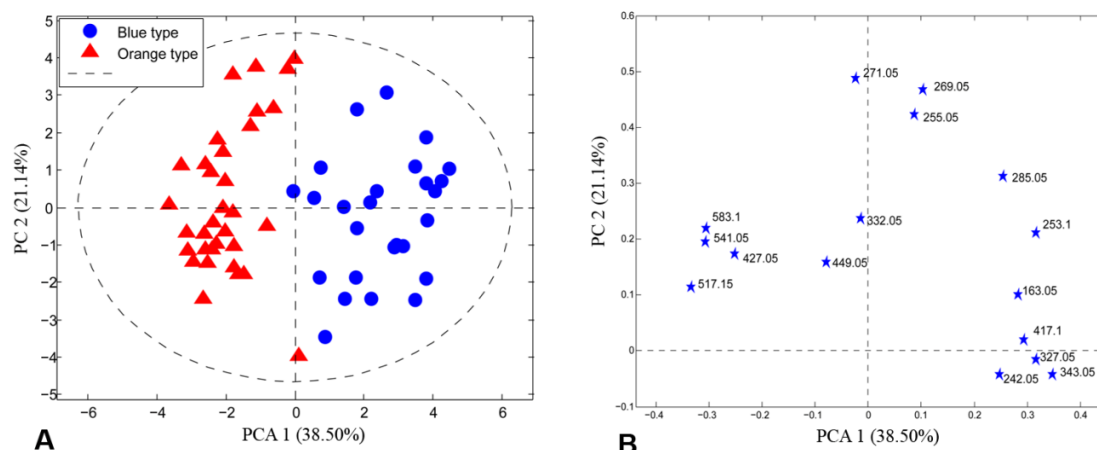
Maseni spektri snimani na 300 °C daju veće masene signale pojedinih vrsta i manje pozadinske signale, te iz tih razloga je ova temperatura korišćena za dalju multivarijantnu analizu (Slika 38) [73].



Slika 38. DART maseni spektri plavog (A, C) i oranž propolisa (B, D) snimani na temperaturi od 300 °C.

4.4.12.1. Analiza glavnih komponenata

Analiza glavnih komponenata je primenjena korišćenjem varijabli izraženih kao relativna zastupljenost jona m/z , uz primenu kovarijantne matrice sa autoskaliranjem. Prve tri komponente opisuju 68,96% od ukupnog varijabiliteta. $PC1$ opisuje 38,96%, a $PC2$ 21,14% od ukupnog varijabiliteta [73].



Slika 39. Grafik odnosa prve dve kompenetne i latentnih varijabli dobijen na osnovu DART analize.

Uzorci koji pripadaju oranž tipu propolisa su lokalizovani na levoj strani grafika, i fenolna jedinjenja kao što su m/z 517,1, 541,1 i 583,1 predstavljaju karakterisitčne markere oranž tipa propolisa (Tabela 13). Ovi signali bi mogli poticati od glikozida ili fenolnih glicerida (Slika 39). Plavi propolisi su pozicionirani sa desne strane grafika. Maseni signali kao što su m/z 163,1, 242,1, 253,1, 327,1, 343,1, 285,05 i 417,1 značajno doprinose razdvajanju ova dva tipa propolisa. Maseni signal na 327,1 bi mogao poticati od pinobanksin-5-metiletar-3-*O*-acetata ili pinobanksin-*O*-propionaat. Maseni signal na m/z 285 bi mogao poticati od deprotonovanog molekula pinobanksin metil etra ili luteolina. Prema literaturnim podacima maseni signali na 163,5 i 255,1 indikuju deprotonovani molekul kumarinske kiseline i pinocambrina ili likuiritigenina, redom [76].

Dalje, maseni signal na m/z 253,1 odgovara deprotonovanom molekulu krisina [76]. Svi maseni signali pozicionirani sa leve strane odgovaraju oranž tipu propolisa. Fenoli na

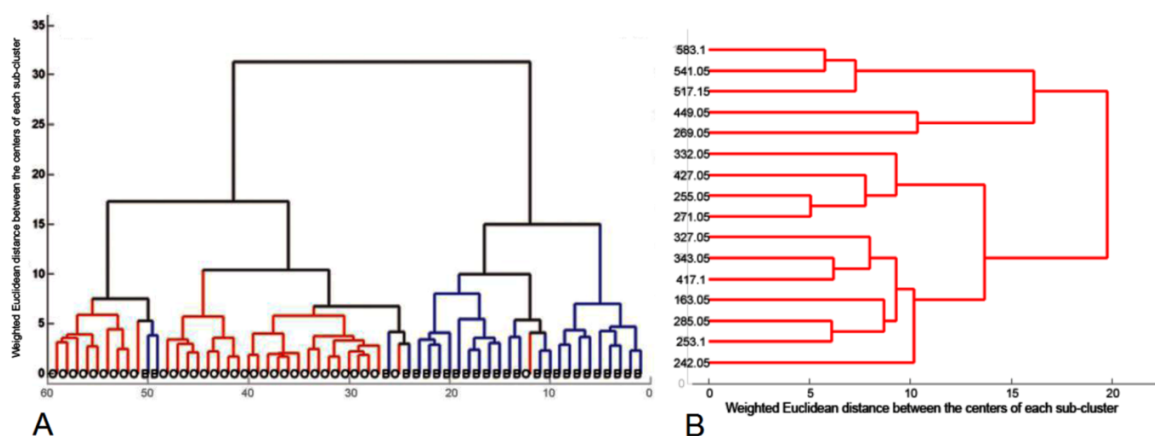
m/z 269,1 i 285,1 su pozicionirani sa desne strane grafika latentnih varijabli i predstavljaju karakteristične fenole plavog tipa propolisa. Ovi signali bi mogli odgovarati galanginu ili apigeninu i kaempferolu [77]. Oba tipa propolisa sadrže fenole koji daju molekulske jone na m/z 269,1, 332, i 449,1 i lokalizovani su između plavog i oranž tipa propolisa. Morlock i saradnici su odredili fenolni profil nemačkog propolisa, i ustanovili da kumarinska kiselina, maseni signali na m/z 253,1 i m/z 255,1 potiču od krisina, pinobembrina ili metoksiflavanona i likuiritigenina. Pik na m/z 271,1 bi mogao poticati od galangina ili apigenina ili od pinostrombina ili benzil-kafeata [77].

Tabela 13. Uticaj fenolnih jedinjenja iz propolisa na glavne komponente

Broj	Promenljiv a	Uticaj promenljive na PC	Marker jedinjenja	Tip propolisa
1	163,1	Pozitivan (PC1)	Kumarinska kiselina	Plavi i oranž
2	242,1	Negativan (PC2)	Nepoznato fenolno jedinjenje	Plavi
3	253,1	Pozitivan (PC1 i PC2)	Krisin ili metoksiflavanon	Plavi i oranž
4	255,1	Pozitivan (PC2)	Pinocembrin ili likuiritigenin	Oranž
5	269,1	Pozitivan (PC2)	Galangin, apigenin, pinostrombin, ili benzil kafeat	Plavi i oranž
6	271,1	Pozitivan (PC2)	Naringenin ili pinostrombin	Oranž
7	285,1	Pozitivan (PC2)	Kaempferol, luteolin, pinobanksin-5- metil etar	Plavi
8	237,1	Pozitivan (PC1)	Pinobanksin-5-methletar-3- <i>O</i> -acetat ili pinobanksin-3- <i>O</i> -propionat	Plavi
9	332,1	Pozitivan (PC2)	Nepoznato fenolno jedinjenje	Plavi i oranž
10	343,1	Pozitivan (PC1)	Nepoznato fenolno jedinjenje	Plavi
11	417,1	Pozitivan (PC1)	Nepoznato fenolno jedinjenje	Plavi
12	449,1	Pozitivan (PC2)	Nepoznato fenolno jedinjenje	Plavi i oranž
13	517,1	Negativan (PC1)	Glikozid ili fenolni dimer	Oranž
14	541,1	Negativan (PC1)	Glikozid ili fenolni dimer	Oranž
15	583,1	Negativan (PC1)	Glikozid ili fenolni dimer	Oranž

4. 4.12.2. Hijerarhijska klusterska analiza (HCA)

Prema DART masenim signalima klasifikacija dva tipa nemačkog propolisa je izvedena primenom hijerarhijske klusterske analize. Prema HPTLC profile **33** od **59** uzoraka je klasifikovano kao oranž, a **26** kao plavi tip propolisa. Jedan klaster sadrži uglavnom oranž uzorke, **32** oranž i **4** plava, drugi klaster sadrži **1** oranž i **22** plava uzorka. Dendrogram dobijen HCA analizom, pokazuje dva klastera pri nivou sličnosti od 30 %. Klaster koji se uglavnom sastoji od oranž uzoraka, pri nivou sličnosti od 16% daje dva manja klastera. Drugi klaster je podeljen na dva manja klastera pri nivou sličnosti od 15%. Nekoliko uzoraka klasifikovanih kao plavi tip je klasifikovano u klasteru koji je uglavnom izgrađen od oranž propolisa. To se može objasniti sličnim kvalitativnim sastavom oba tipa propolisa, gde razlike potiču od kvantitativnog sastava [73].



Slika 40. Dendrogram a) uzoraka nemačkog propolisa i b) varijabli dobijen direktnom analizom u realnom vremenu.

Prema nivou sličnosti od 15% u dendrogramu varijabli, može se uočiti da pikovi na m/z 517,2, 541,1 i 583,1 pokazuju sličnost i karakteristični su uglavnom za propolis oranž tipa. Sa druge strane, deprotonovana fenolna jedinjenja sa masenim signalima na m/z 163,1, 242,1, 253,1, 285,1, 327,1, 343,1 i 417,1 formiraju drugi klaster, dok se varijabla 417,1 izdvaja i gradi zaseban klaster. Ovi rezultati su u saglasnosti sa predodnom klasifikacijom propolisa, prema analizi glavnih komponenta [73] (Slika 40).

4. 4.12.3. Linearno diskriminantna analiza (LDA)

Linearno diskriminantna funkcija dobijena na osnovu masenih spektara sadrži set od **59** uzoraka propolisa, koji čini test set i **27** uzoraka propolisa uglavnom iz stranih zemalja (**11** stranih uzoraka i **16** uzoraka koji se prema HPTLC ponašaju kao smeša oranž i plavog tipa). Na osnovu LDA, moć klasifikacije i predviđanja klasifikacije testiranih uzoraka je prikazana kao procenat klasifikacije, primenom kalibracione jednačine i kros-validacione procedure. Linearno diskriminantne funkcije primenjene na test set, analizirane od strane DART, izračunate su prema linearnim diskriminantnim funkcijama:

Plavi tip

$$D1 = 0,050 \cdot 253,1 - 0,012 \cdot 271,05 + 0,041 \cdot 517,15 + 0,143 \cdot 541,05 + 0,186 \cdot 343,05 + 0,71 \cdot 327,05 - 0,022 \cdot 583,1 - 11,271$$

Oranž tip

$$D2 = 0,018 \cdot 253,1 - 0,012 \cdot 271,05 + 0,131 \cdot 517,15 + 0,112 \cdot 541,05 + 0,06 \cdot 343,05 + 0,0334 \cdot 327 + 0,0812 \cdot 583,1 + 10,138$$

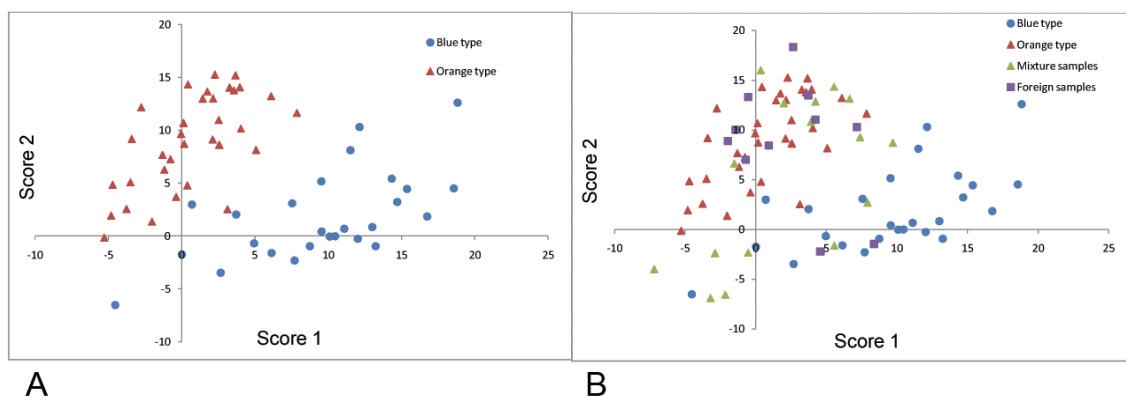
Variable sa značajnim uticajem na prve tri komponente (253,1, 271,1, 343,1, 417,1, 517,1, 541,1 i 583,1) su izabrane za linearno diskriminantno modelovanje. Prema Tabeli 14, standardizovani kanonični koeficijenti izdvajaju variable, ko što su 343,1, 517,1, 583,1 i 327,1 kao najznačajnije za razdvajanje oba tipa propolisa.

Tabela 14. LDA model dobijen DART tehnikom na osnovu izabranih masenih signala.

Std. kanonijski koeficijenti prema LDA modelu zasnovanom na DART analizi	
Varijable	Variate 1
253,10	-0,1910
271,05	-0,0002
517,15	0,40900
541,05	-0,1250
343,05	-0,5410
327,05	-0,2220
583,10	0,48590

Jasno razdvajanje između dva tipa propolisa je demonstrirano na grafiku kalibracionog seta, kao i zajedničke projekcije testiranih uzoraka. Procenat klasifikacije uzoraka koji pripadaju oranž i plavom tipu propolisa iznosi 96,6%, a dobijen koristeći

originalni i kros-validacionu proceduru (94,9%) (Tabela 15). Oranž tip propolisa je klasifikovan sa malo boljom tačnošću (97,0%) nego plavi tip (92,3%).



Slika 41. Grafik skorova latentnih varijabli za kalibracioni (A) i test (B) set LDA modela.

Prema kalibracionom setu većina uzoraka koji predstavljaju smešu plavog i oranž tipa propolisa su klasifikovani kao propolisi oranž tipa, izuzev tri uzorka (Slika 41). Uzorci koji potiču iz drugih zemalja su isto klasifikovani uglavnom kao oranž, verovatno zbog prisustva fenola koji su karaktersitični za propolis oranž tipa.

Tabela 15. DART masena spektroskopija: LDA klasifikacija nemačkog propolisa na oranž i plavi tip

Klasifikacija rezultata				
Tip propolisa		Stepen predviđanja grupnog članstva		
Klasifikacija		Plavi tip	Oranž tip	Ukupno
Originalni	Plavi tip	24	2	26
	Oranž	0	33	33
	% Plavi	92,30	7,70	100,00
	% Oranž	3,00	97,00	100,00
Kros-validaciona procedura	Plavi	24	2	26
	Oranž	1	32	33
	% Plavi	92,30	7,70	100,00
	% Oranž	3,00	97,00	100,00

4.5. Sadržaj ukupnih fenola, flavonoida i relativna antioksidativna aktivnost

4.5.1. Sadržaj ukupnih fenola i flavonoida

Sadržaj ukupnih fenola i flavonoida propolisa predstavlja parametar kvaliteta koji u mnogome zavisi od botaničkog i geografskog porekla. U zavisnosti od fitogeografskog porekla propolis sadrži različite količine fenola i flavonoida [68]. Ukupan sadržaj fenola i flavonoida ukazuje na razlike u kvalitetu oranž i plavog tipa srpskog propolisa. Na osnovu Tabele 16 može se uočiti da uzorci koji pripadaju oranž tipu propolisa ($224,96 \pm 0,18$ mg GAE/g propolisa) imaju veći sadržaj fenola u odnosu na uzorke koji pripadaju plavom tipu propolisa ($195,60 \pm 0,24$ mg GAE/g) što su potvrdile i druge analitičke tehnike kao što su HPTLC, UV/VIS spektrofotometrija, UPLC-LTQ-Orbitrap MS/MS.

Slično kao i kod sadržaja fenola, uzorci koji pripadaju plavom tipu propolisa sadrže manje flavonoida ($100,74 \pm 0,03$ mg QAE/g propolisa) u odnosu na uzorke klasifikovane kao oranž tip ($122,41 \pm 0,03$ mg QAE/g propolisa). Iz Tabele T1 u Prilogu može se uočiti da je sadržaj voska kod uzoraka koji pripadaju plavom tipu veći, čime bi se mogao objasniti manji sadržaj fenolnih jedinjenja. Ovi rezultati su u saglasnosti sa rezultatima dobijenim analizom propolisa [68, 92, 93].

4.5.2. Određivanje antioksidativne aktivnosti propolisa

Na osnovu Tabele 16, može se uočiti da narandžasti tip propolisa ima izraženo veći antioksidativni kapacitet, verovatno zbog veće količine fenola koje sadrži. Narandžasti tip propolisa ima antioksidativnu aktivnost između 21,15% i 87,69%, a plavi tip ima vrednosti između 24,21% i 60,20%. Slični rezultati kao i kod srpskog propolisa su dobijeni prema Kumazawa-u [68]. Sa druge strane, autor navodi kvercetin, kempferol, galangin, fenolne kiseline i feniletil ester kofeinske kiseline, cinamil kofeat kao jedinjenja sa najvećim doprinosom antioksidativne aktivnosti [68].

Tabela 16. Sadržaj ukupnih fenola, flavonoida i relativna antioksidativna aktivnost oranž i plavog tipa propolisa.

Uzorci propolisa	Klasifikacija propolisa	Ukupni fenoli mg EGK/g propolisa	Ukupni flavonoidi propolisa (mg EK/g propolisa)	DPPH %
Propolis-2	Oranž	197,96±0,19	109,42±0,02	45,64±2,73
Propolis-3	Oranž	181,26±0,18	99,25±0,04	36,28±2,80
Propolis-6	Oranž	188,85±0,07	97,17±0,02	34,87±2,94
Propolis-7	Oranž	246,35±0,02	134,27±0,03	53,13±0,07
Propolis-8	Oranž	198,10±0,08	104,70±0,35	42,90±0,14
Propolis-9	Oranž	241,04±0,06	132,75±0,02	60,98±0,28
Propolis-10	Oranž	173,69±0,07	113,74±0,17	38,42±0,07
Propolis-11	Oranž	240,59±0,04	146,37±0,04	57,14±1,47
Propolis-12	Oranž	144,91±0,04	103,63±0,02	21,15±0,07
Propolis-13	Oranž	209,57±0,04	122,88±0,04	39,18±0,07
Propolis-14	Oranž	238,25±0,03	136,03±0,01	77,76±0,01
Propolis-16	Oranž	211,08±0,04	134,26±0,02	50,61±0,12
Propolis-17	Oranž	229,91±0,04	132,95±0,03	48,91±0,12
Propolis-19	Oranž	229,89±0,10	127,48±0,03	67,17±0,01

Propolis-20	Oranž	215,58±0,04	123,49±0,04	49,86±0,07
Propolis-21	Oranž	208,32±0,02	111,16±0,01	68,77±0,12
Propolis-22	Oranž	205,94±0,06	104,71±0,01	41,64±0,12
Propolis-24	Oranž	227,38±0,06	123,97±0,02	54,16±0,07
Propolis-25	Oranž	260,76±0,04	134,61±0,01	60,07±0,01
Propolis-26	Oranž	275,31±0,02	148,98±0,01	72,64±0,12
Propolis-27	Oranž	240,02±0,06	113,25±0,02	76,03±0,12
Propolis-28	Oranž	200,82±0,04	111,45±0,01	37,81±0,18
Propolis-29	Oranž	192,25±0,06	113,93±0,02	37,61±0,07
Propolis-30	Oranž	220,79±0,04	127,38±0,01	39,63±0,07
Propolis-31	Oranž	172,81±0,01	91,66±0,01	28,37±0,07
Propolis-32	Oranž	252,49±0,04	106,55±0,02	54,92±0,07
Propolis-33	Oranž	245,99±0,05	143,15±0,03	69,49±0,12
Propolis-34	Oranž	273,55±0,26	140,87±0,02	68,77±0,12
Propolis-36	Oranž	240,60±0,08	133,44±0,02	46,00±0,12
Propolis-37	Oranž	293,90±0,04	140,25±0,02	86,76±0,01
Propolis-38	Oranž	143,46±0,04	99,068±0,002	39,35±0,12

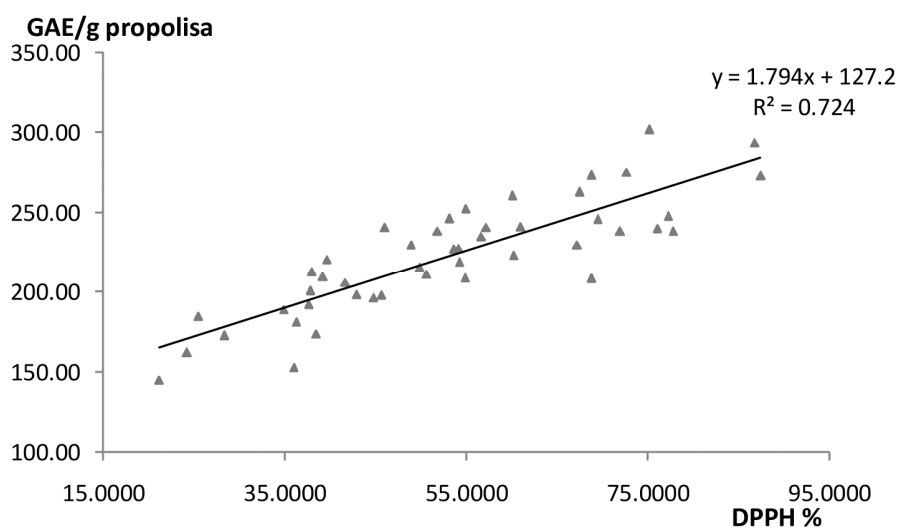
Propolis-40	Oranž	273,16±0,56	131,19±0,01	87,41±0,12
Propolis-41	Oranž	238,58±3,89	133,28±0,02	51,82±0,12
Propolis-42	Oranž	262,92±0,17	143,74±0,01	67,51±0,07
Propolis-43	Oranž	208,88±0,04	103,09±0,06	54,84±0,12
Propolis-44	Oranž	301,93±0,19	152,18±0,01	75,18±0,12
Propolis-45	Oranž	226,90±0,06	118,71±0,01	53,59±0,07
Propolis-46	Oranž	238,39±0,11	125,93±0,01	71,91±0,12
Propolis-47	Oranž	247,76±0,02	119,29±0,02	57,24±0,12
Propolis-51	Oranž	198,38±0,09	106,38±0,01	87,69±0,14
Propolis-1	Plavi	212,86±0,56	112,48±0,02	60,20±0,18
Propolis-4	Plavi	197,43±1,18	95,13±0,04	56,62±0,14
Propolis-5	Plavi	184,61±0,36	87,35±0,03	36,00±0,07
Propolis-15	Plavi	108,19±0,04	90,18±0,01	44,79±0,12
Propolis-18	Plavi	162,22±0,04	121,95±0,03	28,28±0,02
Propolis-23	Plavi	171,01±0,02	90,55±0,01	37,97±0,07
Propolis-35	Plavi	219,09±0,13	88,45±0,04	54,24±0,12
Propolis-39	Plavi	312,39±0,03	100,668±0,002	88,21±4,39

Propolis-48	Plavi	125,31±0,06	123,223±0,03	25,45±0,12
Propolis-52	Plavi	223,37±0,16	101,83±0,04	34,99±0,07
Propolis-53	Plavi	235,09±0,04	96,34±0,03	24,21±0,07

Prema Russo-u i saradnicima CAPE i galangin su prepoznati kao fenoli koji ispoljavaju jaku antioksidativnu moć [94]. Japanski propolis ima slične vrednosti antioksidativne aktivnosti kao srpski [95].

Oranž tip nemačkog propolisa slično kao srpski ima veću antioksidativnu aktivnost, u odnosu na plavi tip. Takođe, autori su našli vezu između sadržaja fenola i flavonoida sa jedne strane i antioksidativne aktivnosti sa druge strane [93].

Antioksidativna aktivnost srpskog propolisa u korelaciji sa sadržajem ukupnih fenola pokazuje linearnu zavisnost ($R^2 = 0,724$). Sa druge strane, nije nađena linearna zavisnost između antioksidativnog kapaciteta i sadržaja ukupnih flavonoida. Dalje, nije nađena linearna zavisnost između pojedinih fenolnih jedinjenja i relativnog antioksidativnog kapaciteta. Antioksidativna moć pojedinih fenolnih jedinjenja se može pripisati sadržaju CAPE, kvercetina, kempferola, galangina, kao i fenolnih kiselina čije je prisustvo utvrđeno drugim analitičkim tehnikama [68].



Slika 42. Linearna zavisnost antioksidativnog kapaciteta određena korišćenjem DPPH.

4.5.3. Sadržaj metala i metaloida u srpskom propolisu

U cilju ispitivanja sadržaja esencijalnih i toksičnih metala, dvadeset dva metala su određena u srpskom propolisu primenom indukovano kuplovane plazme optičke emisije spektroskopije sa ciljem ispitivanja sadržaja esencijalnih i toksičnih metala. Statistički parametri su prikazani u Tabeli 17.

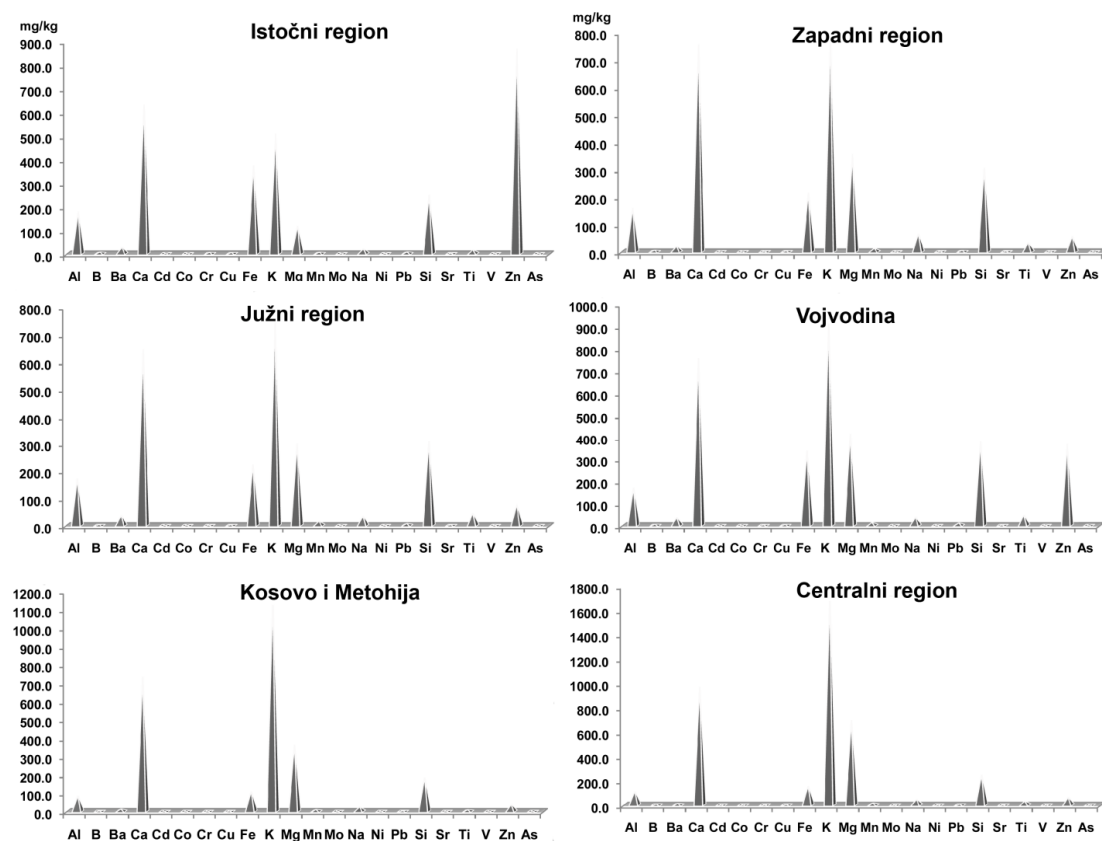
Na osnovu količine esencijalnih i toksičnih metala, srpski propolis se može podeliti u tri grupe. Metali kao što su Al, Ca, Fe, K, Mg, Zn i metaloid Si, su prisutni u koncentraciji većoj od 150 mg/kg. Sadržaj elemenata B, Ba, Cu, Na, Pb, Sr varira od 2,07 do 41,38 mg/kg. Elementi kao što su Cd, Cr, Co, Mo, Ni, V i metaloid As su prisutni u jako maloj koncentraciji ili u tragovima. Živa nije detektovana u ispitivanim uzorcima. Granica detekcije žive iznosi 0.0003 mg/kg. Slični rezultati su dobijeni od strane autora koji su ispitivali sadržaj metala u kineskom propolisu [96]. Brazilski i Španski propolis sadrži veće količine Al, Ca, K, Mg, Zn, Na i metaloid Si. Toksični metali kao što su Cu, Cd, Cr, i Pb su prisutni u niskoj koncentraciji [97, 98].

Sadržaj toksičnih metala je važan parametar sa stanovišta monitoringa zagađenja životne sredine. Prema standardima o hrani, sadržaj Pb ne bi trebalo da prelazi 1 mg/kg, dok prema Codex Alimentarius Food ta granica iznosi 2 mg/kg. Sa druge strane, svetska zdravstvena organizacija (World Health Organisation, WHO) propisuje maksimalnu dozvoljenu koncentraciju Pb do 10 mg/kg u uzorcima sirovog propolisa. Srednja vrednost sadržaja Pb u srpskom propolisu iznosi 7.84 mg/kg, te prema kriterijumima svetske zdravstvene organizacije, srpski propolis se može smatrati bezbednim. Utvrđeno je da je sadržaj toksičnih metala značajno niži u alkoholnim tinkturama propolisa nego u uzorcima sirovog propolisa [98]. Sadržaj Cd u srpskom propolisu je nizak. Postoji nekoliko potencijalnih izvora Cd poput veštačkih đubriva, kanalizacije, otpadnih voda iz industrijskih postrojenja, fosilnih goriva i produkata sagorevanja goriva [96].

Tabela 17. Sadržaj elemenata u srpskom propolisu (izraženi u mg/kg)

	Al	B	Ba	Ca	Cd	Co	Cr	Cu	Fe	K	Mg
Srednja vrednost	155,42	5,16	28,68	748,00	0,18	0,41	1,84	3,62	245,05	951,69	391,36
Medijana	125,48	4,22	12,03	649,20	0,07	0,27	1,10	2,76	197,56	679,32	326,76
Minimum	41,10	1,66	1,07	283,44	0,01	0,03	0,29	0,76	48,02	297,59	92,89
Maksimum	474,57	27,01	340,94	2940,65	3,73	3,27	14,34	18,35	967,41	6438,73	2466,81
	Mn	Mo	Na	Ni	Pb	Si	Sr	Ti	V	Zn	As
Srednja vrednost	14,02	0,14	41,38	0,87	7,84	307,59	2,07	37,92	0,85	195,47	0,14
Medijana	11,78	0,09	32,83	0,67	5,98	259,23	1,78	19,65	0,68	64,90	0,11
Minimum	2,66	LD	10,14	0,26	0,92	105,11	0,41	3,99	0,14	12,10	LD
Maksimum	51,33	0,74	209,21	2,52	43,15	784,57	10,24	214,13	3,82	1466,42	0,59

Nizak nivo Hg (ispod granice detekcije) u uzorcima srpskog propolisa ukazuje na nizak nivo gradskog i industrijskog zagađenja u Srbiji. Nešto veće koncentracije As su nađene u sirovom propolisu iz Južne Srbije i Vojvodine. Toksičnost As zavisi od oblika u kojem se nalazi. As vezan u obliku organskog jedinjenja je manje toksičan nego neorganski As^{3+} [98]. Brojne studije pokazuju da Al prisutan u većoj količini izaziva neurološke probleme i Alchajmerovu bolest. Međutim, poređenjem sadržaja Al u srpskom, španskom i kineskom propolisu može se steći utisak da je ovaj metal svojstven za propolis [97, 98]. Sa druge strane, sadržaj Al u etanolnom ekstraktu propolisa je u koncentracionom opsegu od 2.13 do 29 mg/kg. Na Slici 36 je prikazan sadržaj metala u uzorcima propolisa koji potiču iz određenih regiona u Srbiji. Može se uočiti da je sadržaj Ca, K, Mg i Si visok, i da su ovi elementi svojstveni propolisu. Propolis iz južnog i zapadnog regiona sadrži veće količine Al, Si, Ti, Zn, s tim što propolis iz zapadne Srbije sadrži veće količine mikroelemenata kao što su B, Ca, Mg, Mo. Uzorci propolisa i regiona Kosova i Metohije sadrže veće količine jona elemenata kao što su Cu, Mn, Ni, Pb, Si, i Sr. Iz dobijenih rezultata može se zaključiti da uzorci propolisa iz regiona Vojvodine imaju znatno manji sadržaj metala u odnosu na uzorke iz ostalih regiona (Slika 43).

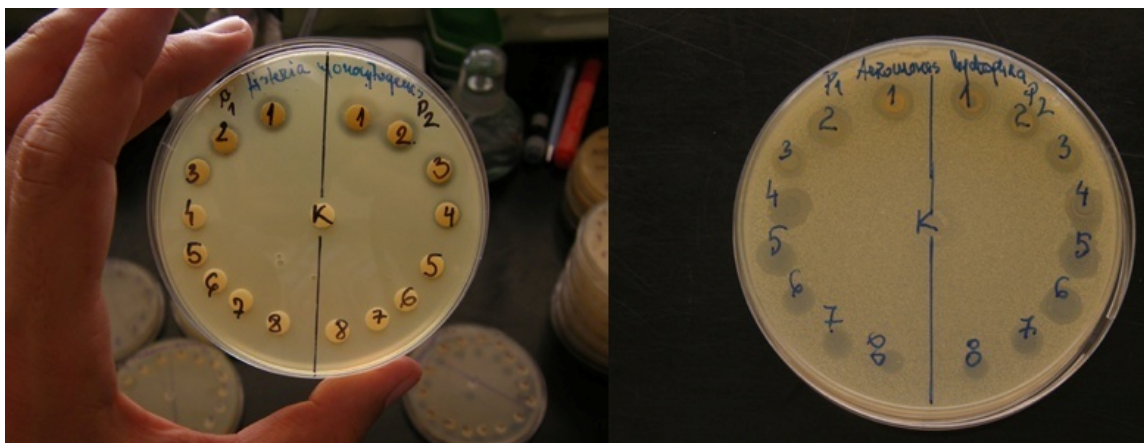


Slika 43. Sadržaj metala u uzorcima propolisa iz različitih regiona Srbije.

4.6. Određivanje antimikrobne aktivnosti propolisa

4.6.1. Disk-difuzioni metod

Antibakterijsko dejstvo propolisa ispitivano je na šest Gram-pozitivnih i sedam Gram-negativnih bakterijskih vrsta prema 21-om slučajno odabranom uzorku propolisa. Dobijeni rezultati su navedeni u prilogu u Tabeli T2 i na osnovu njih se može uočiti da su na antimikrobno dejstvo odabranih propolisa, najveću osetljivost pokazale bakterije kao što su *B. subtilis*, *E. faecalis*, *S. Aureus*, *L. monocytogenes*, *A. hydrophila* i *S. flexneri*. Najveći antimikrobni efekat ispitivanih uzoraka je uočen kod sojeva *B. subtilis* i *L. monocytogenes*, gde se javljaju zone inhibicije od 12 mm (Tabela T2).



Slika 44. Disk difuzioni bioesej za P1 i P2 uzorke protiv *L. monocytogenes* i *A. Hydrophila*.

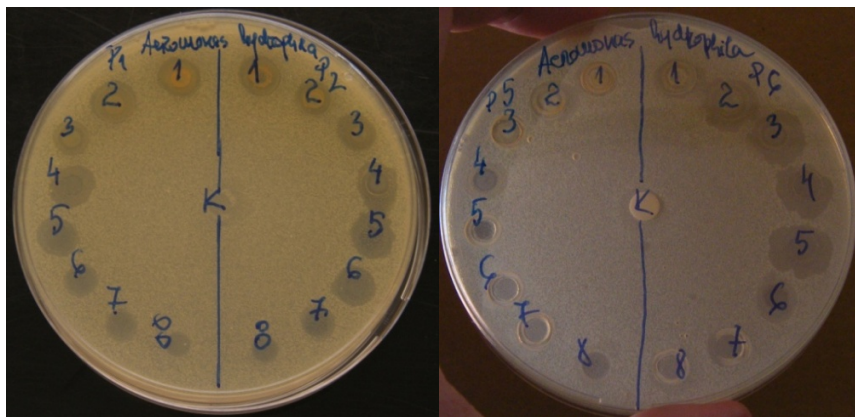
Od 21 ekstrakta propolisa zona inhibicije veća od 12 mm se javila pri delovanju uzoraka oranž tipa propolisa (6, 7, 9) i to pri najvećoj koncentraciji (Prilog, Tabela T2) na *M. luteus*, dok ostali uzorci propolisa nisu pokazali efekat. Sličan antimikrobni efekat su pokazali uzorci (8, 9, 10, 11 i 15) na *S. equisimilis* (Prilog P3).

L. monocytogenes je pokazala veću osetljivost u odnosu na druge ispitivane bakterije prema delovanju svih uzoraka propolisa. Zone inhibicije se javljaju pri znatno nižim koncentracijama za oranž tip propolisa u odnosu na uzorke koji pripadaju plavom tipu propolisa (Tabela T2). Najslabiji efekat na *L. monocytogenes*u pokazali upravo uzorci

koji pripadaju plavom tipu propolisa. *E. faecalis* je dao različite zone inhibicije za analizirane ekstrakte propolisa. Naime, ekstrakti propolisa koji pripadaju plavom tipu (**15 i 51**) su se pokazali kao najmanje efikasni na ovaj soj, pri čemu su dali malu zonu inhibicije pri najvećoj korišćenoj koncentraciji od 127 i 132 mg/ml. Najveći antimikrobni efekat na Gram-pozitivne bakterije pokazali su uzorci propolisa koji su klasifikovani kao oranž tip (**16, 17, 19, 28, 29, 32**). Uzorci propolisa **7, 8 i 9** pokazuju jaku antimikrobnu aktivnost prema *L. monocytogenes*, *B. subtilis* i *E. faecalis*.

Propolisi **1, 2, 3 i 4** su pokazali umerenu antimikrobnu aktivnost. Delovanjem uzoraka **1, 3, 4** (koji pripadaju plavom tipu) i uzorka **2** (oranž tip) javile su se zone inhibicije manjeg prečnika u odnosu na prethodno pomenute uzorke (uglavnom ispod 8 mm). Interesantno je da je *E. cloacae* osetljiva isključivo na delovanje gore navedenih uzoraka propolisa (**1-4**), pri čemu su se zone inhibicije od 8 mm javljale i na najnižim testiranim koncentracijama (Tabela T3). Za ove bakterijske sojeve se ne može uočiti razlika između dva tipa propolisa.

Metanol, koji je korišćen kao kontrola rastvarača, nije pokazao inhibični efekat na rast nijednog analiziranog bakterijskog soja.

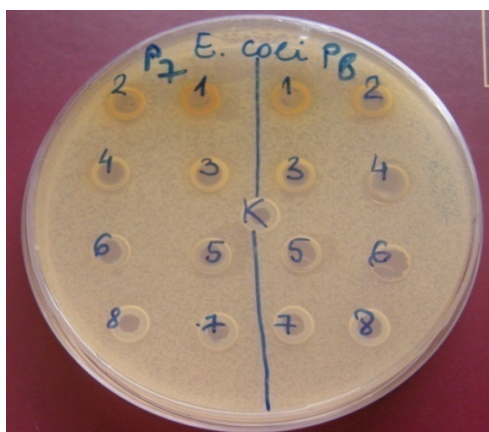


Slika 45. Disk-difuzioni bioesej za uzorke 1, 2, 3 i 6 protiv bakterije *A. hydrophila*.

Od svih analiziranih uzoraka disk-difuzionom metodom najjači antimikrobni efekat na *A. hydrophila* i *S. flexneri* su pokazali uzorci koji pripadaju oranž tipu propolisa (**6, 10, 17, 28, 29 i 30**). Prema rezultatima iz Tabele T2, *A. hydrophila* i *S. flexneri* su najosetljiviji

sojevi Gram-negativnih bakterija na delovanje propolisa (Slika 45). Zone inhibicije kod *A. hydrophila* iznose 8 mm, s tim što se prečnik zona inhibicije povećava povećanjem koncentracije propolisa, a najveće zone imaju prečnik 12 mm. Što se *S. flexneri* tiče, najjači efekat su pokazali uzorci koji pripadaju oranž propolisu **10** i **17**, čija se aktivnost uočava i na najnižim testiranim koncentracijama (zona inhibicije 8 mm, Tabela T2). Ostale Gram-negativne bakterije korišćene u radu su pokazale daleko manju osetljivost i rezistentne su na delovanje većine testiranih ekstrakata propolisa. Testirani propolisi nisu pokazali inhibitorni efekat na rast *E. coli*, osim uzoraka **7**, **8** i **10**, koji su aktivni samo pri višim koncentracijama (Slika 46).

U literaturi postoji veliki broj publikacija koje se odnose na antimikrobnu aktivnost propolisa na *E. coli*. Katircioglu i saradnici su ispitivali antimikrobnu aktivnost etanolnih ekstrakata propolisa iz različitih regiona Turske protiv *E. Coli* [99]. Zone inhibicije su iznosile >12 mm, dok su kod *P. aeruginosa* i *P. mirabilis* pokazali daleko manju osetljivost. Turski propolis potiče od *P. nigra*, *A. poplar*, *P.euphratica* te bi diterpeni i fenolni gliceridi propolisa mogli biti odgovorni za aktivnost prema *E. coli* [90]. Ispitivanjem antimikrobne aktivnosti srpskog propolisa trinaest ekstrakata najveće zone inhibicije su dobijene protiv bakterija *S. aureus* (9-12 mm), *L. monocytogenes* (10-13 mm), *B. subtilis* (9-13 mm), dok sojevi *E. coli*, *P. aeruginosa*, *Serratia marcescens* su dali zone inhibicije od 0 do 2 mm [22].

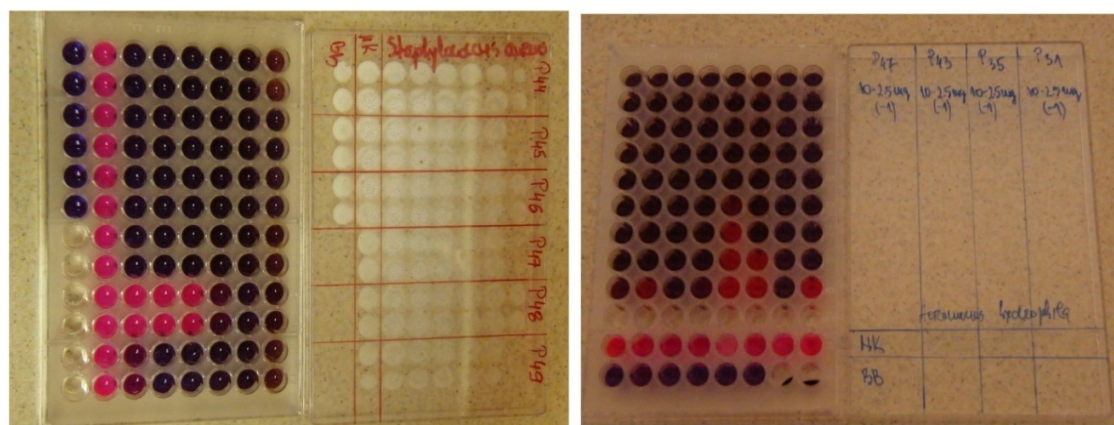


Slika 46. Disk-difuzioni bioesaj za uzorke propolisa **7** i **8** prema bakteriji *E. coli*.

4.6.2. Određivanje minimalne inhibitorne koncentracije (MIC)

Disk-difuzioni test je pokazao da se najveće zone inhibicije rasta javljaju kod: *B. subtilis*, *E. faecalis*, *S. aureus*, *L. monocytogenes*, *A. hydrophila* i *S. flexneri*. Na osnovu rezultata prikazanih u Tabeli T2, ovi sojevi su odabrani za dalju analizu u cilju određivanja MIC.

Rezultati dobijeni MIC esejom su prikazani u Tabeli 18. Može se uočiti da najmanja testirana koncentracija ekstrakata propolisa pokazuje minimalnu inhibitornu aktivnost od 0,08 mg/ml na *L. monocytogenes* i karakteriše uzorak **26** koji prema HPTLC profilu pripada oranž tipu. To je i najjači efekat propolisa zabeležen u ovoj studiji. Nešto slabiju, ali ujedno veoma jaku aktivnost, pokazali su ekstrakti propolisa koji pripadaju oranž tipu **34**, **37** i **38**, kao i uzorci **40** i **47** protiv istog patogena. Raspon MIC koncentracija kod bakterije *L. monocytogenes*, kreće se od 0,08 do 2,18 mg/ml. Međutim, kao što se može videti iz Tabele 18, uglavnom je na nižim koncentracijama zabeležen MIC, a najmanju aktivnost su pokazali ekstrakti plavog tipa propolisa (**15** i **48**) protiv istog patogena. Ekstrakt propolisa **26** ima visoku vrednost ukupnih fenola i flavonoida, što može biti jedan od razloga njegovog najjačeg efekta protiv gore pomenutog patogena (Tabela 16).



Slika 47. Resazurinska reakcija na bakterijskim sojevima *S. aureus* sa ekstraktima propolisa **44**, **45**, **46**, **48** i **49** i *A. hydrophila* sa ekstraktima **17**, **13**, **35**, **31**.

Minimalna inhibitorna koncentracija uzorka **43** je pokazala ujedno i najjači efekat na bakteriji *S. aureus*. Ekstrakti propolisa koji su pokazali antimikrobnu aktivnost prema *S. aureus* sa koncentracijom od 0,32 do 0,44 mg/ml, uglavnom potiču iz južne Srbije (Tabela 18), pa možemo reći da bi uzrok tome mogao biti isto geografsko i botaničko poreklo. Najmanji zabeležen efekat prema istom patogenu, sa koncentracijom većom od 10 mg/ml, pokazali su ekstrakti propolisa koji pripadaju plavom tipu **4, 5, 15** i oranž **3, 6, 10, 12, 19, 29, 30 i 32**.

Tabela 18. Minimalne inhibitorne koncentracije (MIC) propolisa izražene u mg/ml.

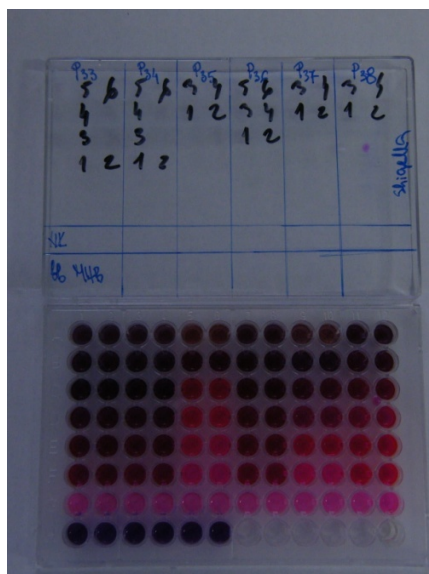
Uzorci propolisa		<i>Aeromonas hydrophila</i>	<i>Shigella flexneri</i>	<i>Listeria monocytogenes</i>	<i>Staphylococcus aureus</i>	<i>Bacillus subtilis</i>	<i>Enterococcus faecalis</i>
		MIC	MIC	MIC	MIC	MIC	MIC
Oranž	2	3,03	6,07	0,38	3,03	1,52	6,07
Oranž	3	3,43	6,86	0,86	13,71	3,43	0,86
Oranž	6	6,63	3,32	0,83	13,27	3,32	1,66
Oranž	7	13,37	7,43	1,86	7,43	14,85	1,86
Oranž	8	15,05	7,52	1,88	10,53	3,76	1,88
Oranž	9	12,88	7,16	0,89	7,16	3,58	1,79
Oranž	10	7,25	1,81	0,91	14,50	1,81	0,91
Oranž	11	14,12	3,53	0,44	7,06	0,44	0,88
Oranž	12	12,35	12,35	1,54	12,35	0,77	6,18
Oranž	13	3,76	7,52	0,94	0,47	0,94	0,94
Oranž	14	3,56	3,56	0,89	0,44	0,89	1,78
Oranž	16	12,28	3,07	0,77	6,14	0,38	1,53
Oranž	17	5,48	1,37	0,34	5,48	0,34	0,34
Oranž	19	13,73	6,86	0,86	13,73	0,43	3,43
Oranž	20	1,60	6,40	0,80	0,40	0,80	1,60
Oranž	21	3,07	6,14	0,77	0,38	0,38	1,53
Oranž	22	7,33	14,65	0,92	0,45	0,92	3,66
Oranž	24	1,54	3,86	0,97	0,48	0,97	1,93
Oranž	25	1,06	3,54	1,77	0,44	0,44	1,77
Oranž	26	1,86	1,01	0,08	0,5	1,01	2,02
Oranž	27	8,71	8,71	2,18	1,09	2,18	4,36
Oranž	28	3,94	3,94	0,49	7,88	1,97	15,77

Oranž	29	5,80	2,90	0,36	11,60	2,90	11,60
Oranž	30	8,04	8,04	0,50	16,08	8,04	1,00
Oranž	31	1,41	2,35	0,94	0,59	0,59	2,35
Oranž	32	4,72	4,72	0,29	9,44	2,36	1,18
Oranž	33	0,88	3,50	0,88	0,43	0,43	0,43
Oranž	34	0,28	3,51	0,28	0,44	0,44	0,44
Oranž	36	3,57	7,14	0,44	0,44	0,89	0,44
Oranž	37	4,51	9,03	0,36	1,13	2,26	2,26
Oranž	38	7,48	14,96	0,30	0,46	0,94	1,87
Oranž	40	3,39	8,48	0,42	0,53	1,06	2,12
Oranž	41	0,91	3,03	0,76	0,38	0,38	1,51
Oranž	42	1,16	3,87	0,97	0,48	0,97	1,94
Oranž	43	1,02	5,10	0,64	0,32	0,64	1,28
Oranž	44	0,53	8,85	1,11	0,55	2,21	2,21
Oranž	45	1,04	6,90	0,86	0,43	0,86	1,73
Oranž	46	0,34	8,43	1,05	0,52	1,05	2,11
Oranž	47	3,30	8,25	0,41	0,51	2,06	2,06
Oranž	49	3,39	14,44	0,23	1,06	1,06	2,12
Oranž	50	4,61	10,85	0,42	0,48	0,96	1,92
Oranž	51	16,82	8,41	1,05	4,21	8,41	16,82
Plavi	1	3,86	4,63	1,93	3,86	3,86	3,86
Plavi	4	7,10	7,10	0,89	14,20	7,10	1,78
Plavi	5	14,46	14,46	1,81	14,46	7,23	3,61
Plavi	15	12,93	12,93	6,46	12,93	3,23	12,93
Plavi	18	3,16	6,32	3,16	0,79	1,58	3,16
Plavi	23	6,76	13,53	0,42	1,69	13,53	3,38
Plavi	35	3,29	8,21	4,11	4,11	8,21	8,21
Plavi	48	4,77	10,06	10,6	5,30	10,6	10,6

Plavi	52	7,16	7,87	1,79	1,07	3,58	3,58
Plavi	53	4,25	14,17	3,54	1,77	3,54	7,09
Plavi	39	5,0	10,00	2,39	1,25	2,50	5,00

Minimalne inhibitorne koncentracije na *B. subtilis* variraju u rasponu od 0,43 mg/ml do 14,83 mg/ml (Tabela 18). Od svih ispitivanih uzoraka, najveći broj njih je dao MIC na 1,23 mg/ml. Ekstrakti propolisa **11**, **16**, **17**, **19**, **21**, **23**, **33**, **34** i **41** pokazali su najveću antimikrobnu aktivnost pri koncentraciji od 0,38 do 0,44 mg/ml. Ovi ekstrakti pripadaju oranž tipu propolisa, koji u sebi sadrže velike količine fenola odgovornih za njihov jak antimikrobni efekat (Tabela 16).

Minimalne inhibitorne koncentracije prema *E. faecalis* variraju u rasponu od 0,34 do 16,82 mg/ml. Kao što se može videti iz Tabele 18, MIC vrednosti su relativno niske u poređenju sa istim vrednostima kod *S. aureus*. Najjači antibakterijski efekat prema *E. faecalis* pokazali su ekstrakti propolisa oranž tipa **17**, **33**, **34** i **36** u rasponu koncentracija od 0,43 do 0,62 mg/ml. Ovi ekstrakti pripadaju oranž tipu propolisa koji ima jako visoki sadržaj polifenola, koji su najverovatnije zaslužni za njihov antimikrobni efekat. Ekstrakti propolisa **15**, **48**, **31**, **28** i **29** imaju najmanji efekat protiv ovog patogena sa MIC većim od 11 mg/ml.



uzorci propolisa koji imaju visok procenat galangina imaju nižu vrednost MIC, dok Mercan prepoznaje krisin kao antimikrobni agens čije visoke koncentracije inhibiraju Gram-negativne bakterije [100, 101]. Ekstrakti koji su pokazali najslabiju antimikrobnu aktivnost su **5** i **15** (Tabela 18). Među njima uzorak **15** se ističe kao ekstrakt koji ima najniži sadržaj flavonoida i polifenola od svih analiziranih uzoraka propolisa (Tabela 16). Prema HPTLC i UPLC-MS/MS studijama, uzorak **15** je karakterističan i po tome što ne sadrži fenole karakteristične za topola tip propolisa. Pored ekstrakata **5** i **15** slabu antimikrobnu aktivnost ispoljili su i uzorci **8**, **12**, **19**, **23**, **38** i **51**. Najniža koncentracija propolisa koja predstavlja MIC protiv *A. hydrophila* za uzorke **34** i **46** ujedno predstavlja i najniže MIC vrednosti u ovom istraživanju (Slika 48). Razlike u osetljivosti na antimikrobne agense koje se uočavaju između Gram-pozitivnih i Gram-negativnih bakterija najverovatnije potiču od razlika u strukturi i hemijskom sastavu bakterijskog zida. Čelijski zid Gram-negativnih bakterija je višeslojan i prisustvo dvoslojne spoljašnje membrane predstavlja prirodnu barijeru za prodiranje antibiotika i drugih stranih materija u unutrašnjost ćelije. Sa druge strane, Gram-pozitivne bakterije imaju jednoslojan čelijski zid i osetljivije su na delovanje antimikrobnih agenasa [100-103]. Prema drugim autorima spoljašnja membrana samo može da uspori ulazak lipofilnih materija u bakterijsku ćeliju. Za otpornost prema propolisu odgovorne su pumpe u ćelijskoj membrani koje sprečavaju ulazak konstituentima propolisa ili ih aktivno izbacuju iz ćelije [103].

Poređenjem MIC vrednosti testiranih antibiotika i ekstrakata propolisa, može se uočiti da pojedini ekstrakti koji pripadaju oranž tipu propolisa pokazuju antimikrobni efekat kao i testirani antibiotici (Tabele 18 i 19).

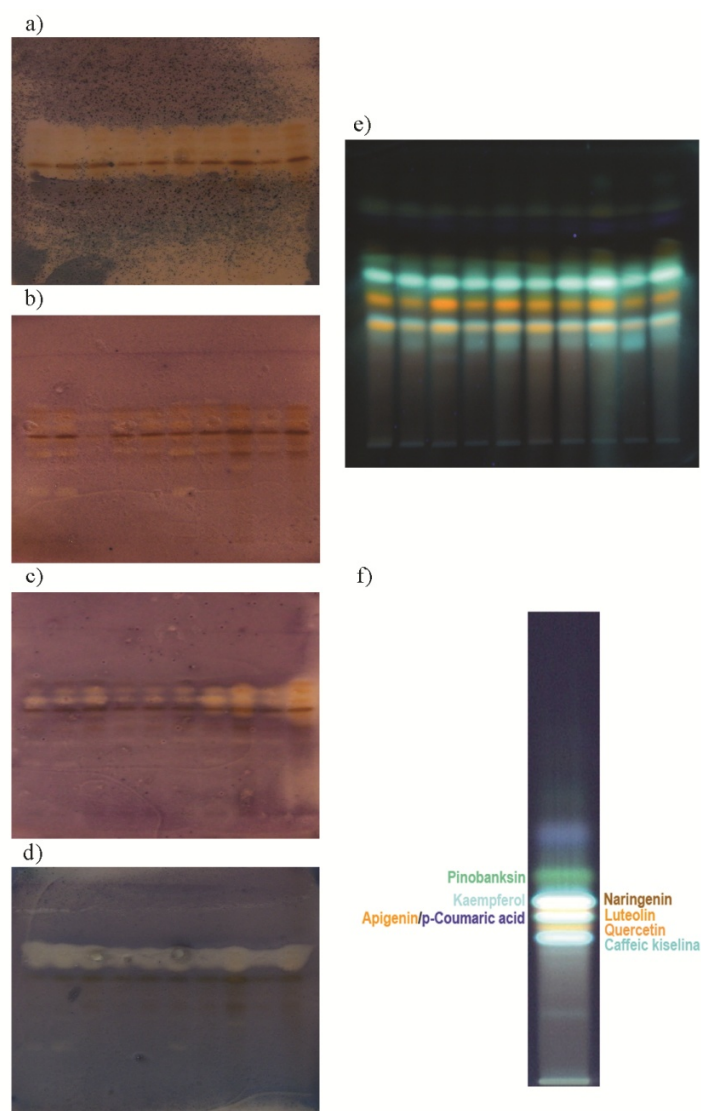
Tabela 19. Minimalne inhibitorne koncentracije antibiotika (mg/ml).

Bakterijski sojevi	Ampicilin	Streptomicin	Rifampicin
<i>Enterobacter cloacae</i> ATCC 49141	0,80	0,20	0,40
<i>Proteus mirabilis</i> ATCC 23933	0,60	0,20	0,40
<i>Pseudomonas aeruginosa</i> ATCC 13442	-	0,40	0,20
<i>Salmonella enteritidis</i> ATCC 13076	1,00	0,10	0,20
<i>Shigella flexneri</i> ATCC 9199	0,40	0,10	0,10

4.6.3. Bioautografija

Bioautografija je izvedena na četiri soja bakterija: *B. subtilis*, *E. faecalis*, *L. monocytogenes* i *S. aureus*. U ovoj studiji su odabrani uzorci koji pripadaju oranž tipu propolisa (16, 17, 26, 33, 34, 36, 37, 42, 45, 46), jer prema predhodnim metodama pokazuju snažan efekat na gore navedene sojeve bakterija. Na Slici 49 su prikazani hromatogrami oranž tipa propolisa, nakon uranjanja u bakterijsku suspenziju. Na osnovu Slike 49 se može uočiti da uzorci 26 i 45 daju veće zone inhibicije, verovatno jer sadrže veće količine fenola na hromatogramu. Takođe, prema Tabeli 18 se može videti da ovi uzorci ispoljavaju snažan antimikrobni efekat na odabrane bakterije. Uzorci 42, 33 i 37 pokazuju slab efekat na *L. monocytogenes* (Tabela T2). Sa druge strane, poređenjem fenolnog HPTLC profila i bioautografske analize propolisa utvrđeno je fenoli kao što su krisin, kvercetin, kempferol, *p*-kumarinska, kofeinska kiselina imaju efekat na gore navedene sojeve bakterija.

Pod ovim hromatografskim uslovima nekoliko zona ima identičnu R_F vrednost te antimikrobna aktivnost može biti rezultat sinergističkog delovanja ispitivanih fenola. Antibakterijska aktivnost iranskih propolisa se može pripisati prisustvu flavonoida (naringenin, pinostrombin, krisin). Ne postoje dostupni podaci za antimikrobnu aktivnost pinocembrina protiv *L. monocytogenes*. Prema Vakuero-u, kofeinska kiselina i kvercetin pokazuju visoku antimikrobnu aktivnost protiv *L. Monocitogenes* [104].



Slika 49. Bioautografska analiza ekstrakta propolisa na bakterijske sojeve sa leva na desno odozgo na dole a) *B. subtilis*, b) *E. faecalis*, c) *L. monocytogenes*, d) *S. aureus*, e) fenolni profil analiziranog propolisa, f) standardna fenolna jedinjenja.

4. 6.4. Procena antimikrobne aktivnosti primenom HPTLC metode i multivarijantnih tehnika

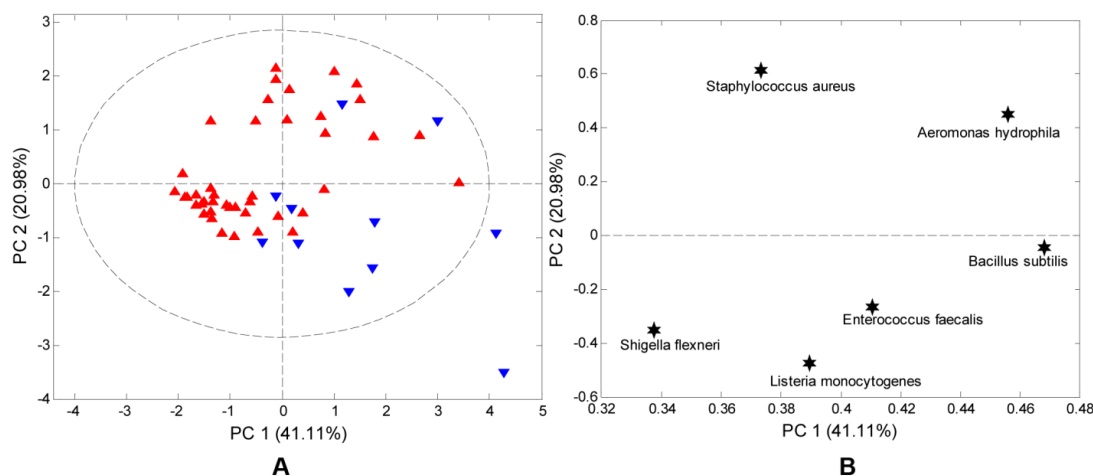
4. 6.4.1. Predtretman podataka

U ovoj studiji su odabrani uzorci koji pripadaju oranž tipu, kao dominantnijem tipu propolisa. Takođe, poređenjem antimikrobne aktivnosti oranž i plavog tipa propolisa, može se uočiti da uzorci koji pripadaju oranž tipu propolisa ispoljavaju veći antimikrobni efekat na ispitivane bakterije.

Prilikom izgradnje modela, korelaciono optimizovana metoda savijanja (COW) i standardizovano normiranje promenljivih (Standard normal variate, SNV) je primenjeno pre konstrukcije multivarijantnog modela. Uzorak **10** je izabran kao referentni za optimizovanu metodu savijanja.

4.6.4.2. Analiza glavnih komponenta primenjena na antimikrobnu aktivnost

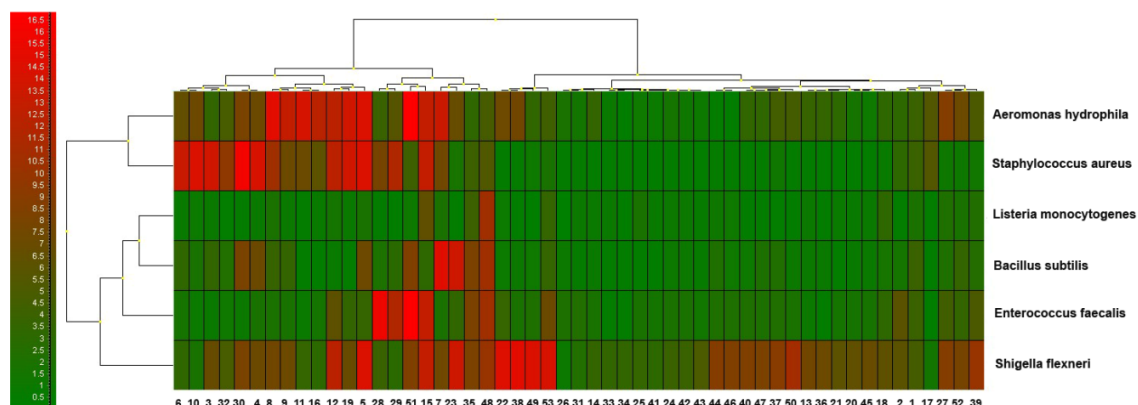
PCA primenjena na matricu od 42 uzorka i 6 varijabli ($p(1/MIC)$) koristeći matriks kovarijanse sa autoskaliranjem rezultuje dvokomponentnim modelom koji opisuje 62,09% varijanse. Vrednosti međusobnog odnosa komponenta $PC1$ i $PC2$, odnosno njihove uzajamne projekcije, su prikazane na Slici 50. Prve dve komponente opisuju 41,11% i 20,98% od ukupnog varijabiliteta, redom. Idući duž $PC1$ od negativnih ka pozitivnim vrednostima, može se uočiti razdvajanje propolisa na plavi i oranž, dok se duž $PC2$ mogu uočiti dve podgrupe propolisa oranž tipa. *S. aureus* se pozitivno koreliše sa $PC2$ i duž ove komponente su oranž propolisi razdvojeni u dve podgrupe. Prema grafiku latentnih varijabli može se uočiti da *A. hydrophila*, *B. subtilis* utiču na $PC1$ pozitivno se korelišući, dok *S. flexneri* ima negativan uticaj na $PC1$. Sa druge strane, *E. faecalis*, *S. flexneri* i *L. monocytogenes* pokazuju negativan uticaj na $PC2$.



Slika 50. PCA grupisanje propolisa prema antimikrobnoj aktivnosti.

4.6.4.3. Toplotna mapa

Minimalna inhibitorna aktivnost oranž tipa propolisa je prikazana konstruisanjem toplotne mape (Slika 51) u vidu matriksa koji grafički prikazuje klasifikaciju ispitivanih uzoraka i antimikrobne aktivnosti, istovremeno. Crvene i zelene nijanse boja pojedinih ćelija matriksa prikazuju vrednosti MIC ispitivanih uzoraka pri čemu zelene ćelije pokazuju uzorke sa manjim MIC vrednostima, a crvene sa većim. Dobijena toplotna mapa potvrđuje prisustvo dva podtipa oranž propolisa. Uzorci koji grade klaster sa desne strane toplotne mape pokazuje nižu antimikrobnu aktivnost prema *A. hydrophila* i *S. aureus*. Skoro svi ispitivani uzorci imaju snažan uticaj na *L. monocytogenes*. Može se uočiti da uzorci **26** i **31** pokazuju najveći uticaj na sve ispitivane bakterije. Uzorci **5** i **48**, koji pripadaju plavom tipu propolisa, pokazuju slabu aktivnost na sve ispitivane sojeve bakterija. Dalje, uzorci **1**, **35** i **53** pokazuju slabu aktivnost na ispitivane bakterije. Skoro svi uzorci propolisa pokazuju nižu antimikrobnu aktivnost prema *S. flexneri*, što je u saglasnosti sa rezultatima iz Tabele 18. Uzorci koji grade podklaster sa desne strane (**14**, **24**, **25**, **33**, **34**, **41**, **43**) pokazuju snažan efekat na ispitivane bakterije, izuzev na *S. flexneri*. Ovi uzorci pripadaju plavom tipu propolisa.



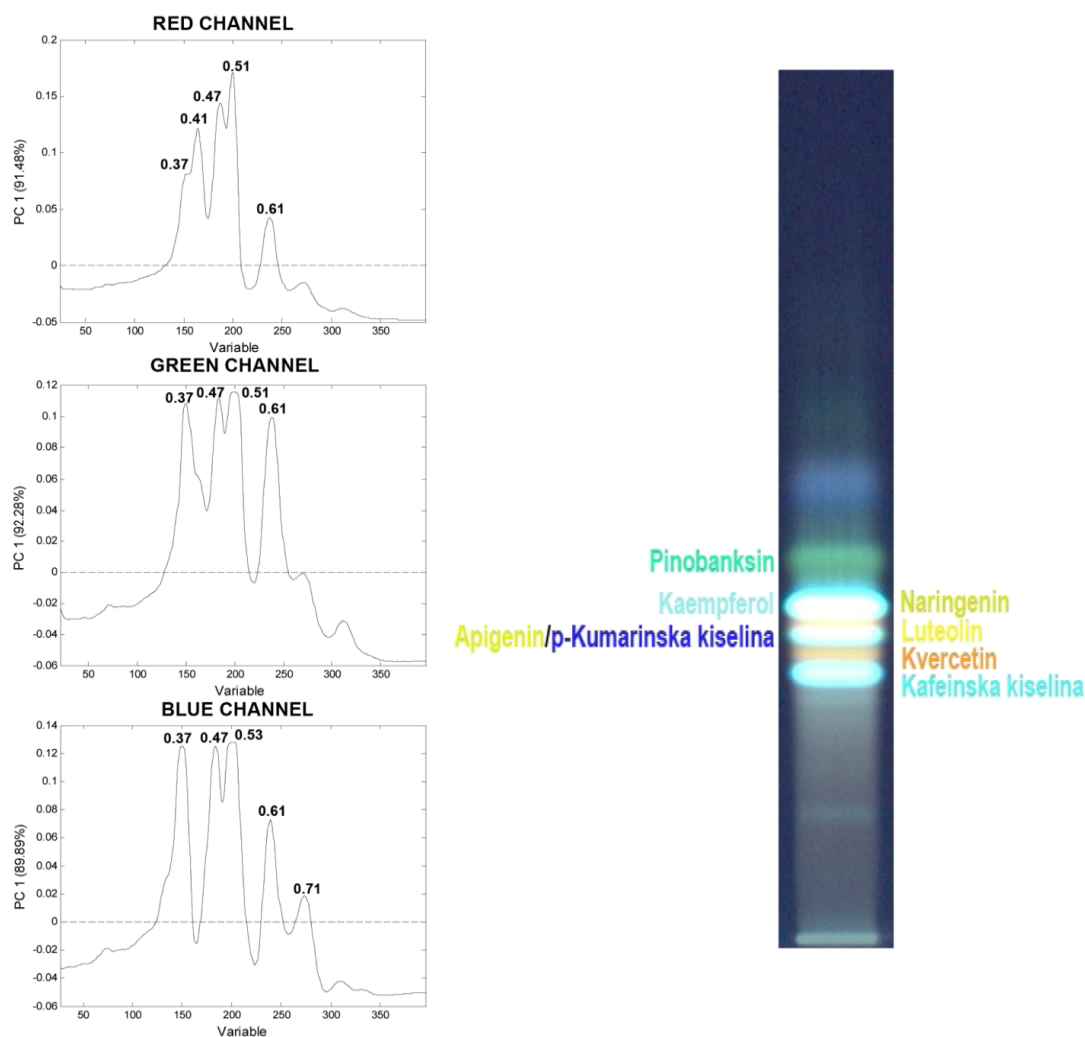
Slika 51. Toplotna mapa zasnovana na antimikrobnoj aktivnosti (zelene ćelije-uzorke sa manjim MIC vrednostima, crvene ćelije-uzorke sa većim MIC vrednostima).

4. 6. 5. Veza između antimikrobne aktivnosti i HTPLC rezultata

4.6.5.1. Analiza glavnih komponenta

PCA je primenjena u cilju izdvajanja varijabli koje odgovaraju fenolima sa potencijalno izraženim antimikrobnim svojstvima. Uprkos tome da PCA ne daje informacije o doprinosu pojedinih jedinjenja (koje odgovaraju varijablama) na antimikrobno svojstvo, grafik latentnih varijabli prepoznaje fenolna jedinjenja koja bi potencijalno doprinela antimikrobnoj aktivnosti (Slika 52).

Fenoli koji potencijalno ispoljavaju antimikrobno svojstvo su kofeinska kiselina ($R_F = 0,37$), kvercetin ($R_F = 0,41$), apigenin/*p*-kumarinska kiselina, luteolin ($R_F = 0,47$), kaempferol/naringenin ($R_F = 0,51$), pinobanksin ($R_F = 0,61$) i nepoznato jedinjenje na $R_F = 0,71$. Na osnovu Slike 52 se može zaključiti da kvercetin, apigenin/*p*-kumarinska kiselina, luteolin pozitivno utiču na $PC1$, što se i moglo očekivati s obzirom da kvercetin i luteolin daju crvene zone. Apigenin/kumarinska kiselina daju intenzivne zone plave boje. Krisin takođe daje crvenu zonu i mogao bi imati istu R_F vrednost kao luteolin. Skoro sve identifikovane zone (kofeinsku kiselinu, kvercetin, apigenin/*p*-kumarinska kiselina, luteolin, kempferol/naringenin, pinobanksin) pokazuju uticaj na $PC1$.



Slika 52. Identifikovana fenolna jedinjenja na oranž propolisu prema HPTLC.

4.6.5.2. Metoda delimičnih najmanjih kvadrata

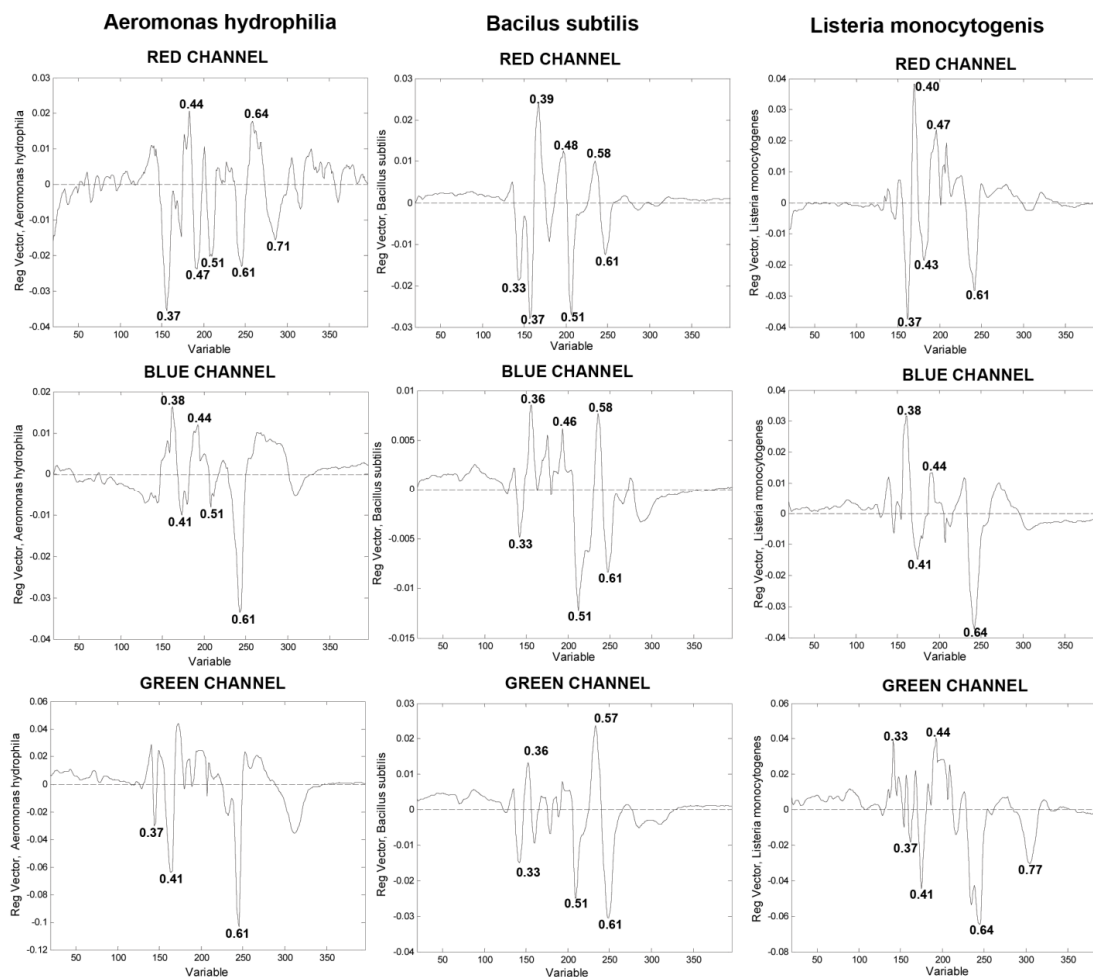
PLS metoda je primenjena u cilju nalaženja veze između HPTLC fenolnog profila i antimikrobne aktivnosti ispitivanih uzoraka propolisa. Na osnovu vrednosti regresionih koeficijenata PLS modela, moguće je potencijalno identifikovati jedinjenja koja poseduju antimikrobnost, što odgovara negativnim regresionim pikovima.

Sa druge strane, model nije namenjen za predviđanje antimikrobne aktivnosti nepoznatih uzoraka, te iz tih razloga set nije podeljen na kalibracioni i test set. Varijable sa VIP grafikama varijabli koje imaju vrednost veću od 1 su relevantne za objašnjavanje

antimikrobne aktivnosti, dok one sa VIP vrednostima manjim od 0,3 imaju zanemarljiv doprinos ili ne utiču na antimikrobnost. Parametri PLS modela na šest bakterijskih sojeva su prikazani u Tabeli 16. VIP varijable dobijenih modela su prikazane u Prilogu, na slici 2 i 3.

Negativni regresioni koeficijenti PLS modela na *A. hydrophila* odgovaraju kofeinskoj kiselini, apigeninu/*p*-kumarinskoj kiselini, luteolinu/krisinu, pinobanksinu i jedinjenju sa $R_F = 0,71$. Na osnovu modela dobijenog za plavi kanal varijable sa najvećim doprinosom antimikrobnoj aktivnosti su kvercetin i pinobanksin. Zeleni kanal pokazuje veći uticaj kofeinske kiseline, kvercetina i pinobanksina. Kvercetin je prepoznat kao antimikrobni agens protiv *A. hydrophila*. Takođe, kofeinska kiselina ispoljava antimikrobna svojstva protiv *A. hydrophila* [105]. Antimikrobna aktivnost iranskog propolisa se može pripisati prisustvu velikih količina flavonoida (naringenin, pinostrombin, krisin) [106]. (Slika 53).

Prema VIP grafiku varijabli, jedinjenja kao što su kofeinska kiselina, apigenin/*p*-kumarinska kiselina i pinobanksin imaju uticaj na *S. flekineri* bakteriju. Pozitivni regresioni koeficijenti odgovaraju kvercetinu, što ukazuje na njegov antagonistički efekat. Ovi rezultati potvrđuju i ispitivanja prema kojima kvercetin i njegovi estri ne ispoljavaju aktivnosti prema *S. Flexneri* ispod koncentracije od 100 mg/ml [103]. Jedinjenja kao što su kofeinska kiselina i pinobanksin, apigenin/*p*-kumarinska kiselina odgovaraju vrednostima koje imaju negativne regresione koeficijente sa vrednostima. Slični rezultati su dobijeni za plavi i zeleni kanal. Parametri PLS modela su prikazani u Tabeli 19.



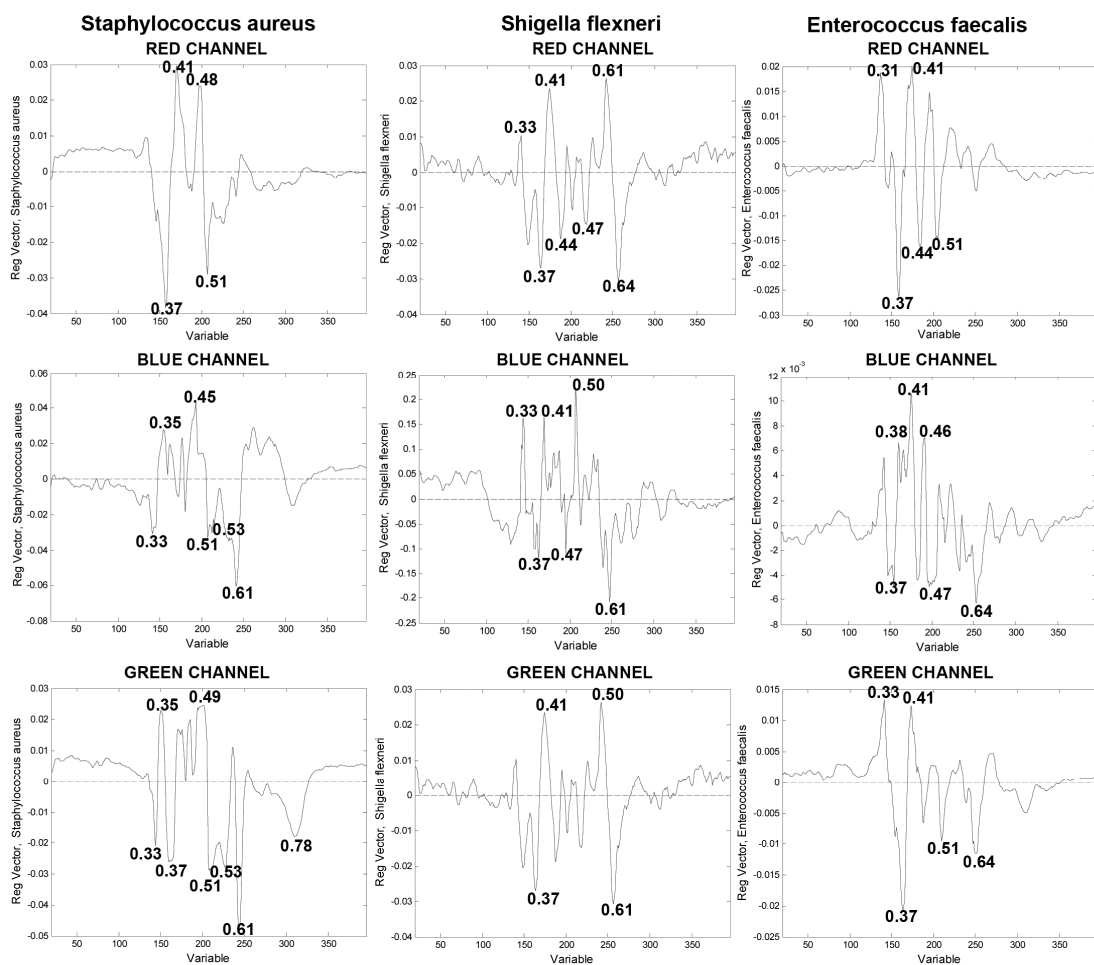
Slika 53. Regresioni koeficijenti PLS modela za *Aeromonas hydrophilia*, *Bacillus subtilis* i *Listeria monocytogenes*.

Jedinjenja sa R_F vrednošću od 0,33 i pinobanksin pokazuju negativne doprinose na antimikrobne aktivnosti za zeleni kanal, dok kofeinska kiselina i apigenin /p-kumarinska kiselina za plavi kanal. Taguri i saradnici ispitivali antimikrobnu aktivnost prečišćenih fenola protiv 26 vrsta bakterija kao i uticaj kofeinske kiseline na *S. flexneri*. Dobijeni rezultati ukazuju na antimikrobnu aktivnost kofeinske kiseline prema *S. flexneri* [107]. (Slika 54).

Kofeinska kiselina, pinobanksin i jedinjenje sa $R_F = 0.43$ značajano doprinose antimikrobnoj aktivnosti *L. monocytogenes*. PLS model za plavi kanal pokazuje značajan

uticaj pinobanksina i kvercetina prema *L. monocitogenes*. Prema zelenom i plavom kanalu, kofeinska kiselina ima neznatan uticaj na antimikrobnu aktivnost. Prema PLS modelu za zeleni kanal jedinjenja sa R_F vrednostima koja odgovaraju kofeinskoj kiselini, kvercetinu, pinobanskinu pokazuju uticaj na $p(1/MIC)$ (Slika 53). Prema Rodriguez Vakuero i saradnicima kofeinska kiselina i kvercetin pokazuju antimikrobnu aktivnost prema *L. monocitogenes* [104]. Parametri PLS modela su prikazani u Tabeli 19.

Prema VIP grafiku varijabli fenolna jedinjenja kao što su kofeinska kiselina, kvercetin, apigenin/*p*-kumarinska kiselina, pinobanksin pokazuju značajan uticaj na antimikrobnu aktivnost *S. aureus* (Prilog, Slika 3). Fenolna jedinjenja kao što su kofeinska kiselina i krisin, imaju veći doprinos protiv *S. aureus* za model dobijen prema crvenom kanalu. Kvercetin i jedinjenje sa $R_F = 0,48$ pokazuju manji uticaj na aktivnost. Prema zelenom kanalu kofeinska kiselina, apigenin/*p*-kumarinska kiselina, kempferol/naringenin, iskazuju pozitivan uticaj na aktivnost. Prema plavom kanalu, kempferol/naringenin, a nepoznato jedinjenje 1 pokazuje pozitivan doprinos protiv bakterija. (Slika 54). Toit procenjuje antimikrobno dejstvo izabranih flavonoida prisutnih u propolisu, pojedinačno ili sa CAPE. Kvercetin značajno inhibira rast *S. aureus*, dok je u kombinaciji sa CAPE antimikrobno dejstvo smanjeno, sugerišući antagonizam [108].



Slika 54. Regresioni koeficienti PLS modela za ispitivane bakterije.

Prema PLS modelu u slučaju *B. subtilis* jedinjenja sa izraženim antimikrobnom aktivnošću su krisin i jedinjenja sa $R_F = 0,33$ i $0,61$ za zeleni i plavi kanal (Slika 53). Fenolna jedinjenja za plavi i zeleni kanal su pinobanksin i kempferol/naringenin koji pokazuju negativan doprinos na $p(1/MIC)$. Kofeinska kiselina, apigenin/*p*-kumarinska kiselina imaju uticaj na antimikrobnu aktivnosti prema modelu za crveni kanal, dok apigenin/*p*-kumarinska kiselina. Prema PLS modelu za *E. faecalis* nekoliko fenola kao što su kofeinska kiselina, pinostrombin, apigenin/*p*-kumarinska kiselina pokazuju negativne vrednosti koeficienata. Pozitivni koeficijent na *E. faecalis* prema crvenom kanalu ima

kvercetin. Zeleni i plavi kanal pokazuju uticaj kofeinske kiseline, apigenin/*p*-kumarinske kiselina, galangina, dok kvercetin i jedinjenje i sa R_F vrednosti 0.33 se pozitivno korelišu sa aktivnošću (Slika 54). Dobijeni rezultati su u saglasnosti sa Puupponen-Pimia^È, jer kvercetin ne inhibira rast *E. faecalis* [109]. PLS modeli dobijeni prema HPTLC fenolnom profilu za šest sojeva bakterija. Parametri PLS modela su prikazani u Tabeli 19.

Tabela 19. PLS parametri modela na ispitivane bakterije za sva tri kanala.

Bakterija	Kanal	RMSEC	RMSECV	Latentne varijable
<i>Aeromonas hydrophila</i>	Crveni kanal	0,34	0,42	3
	Plavi kanal	0,42	0,45	1
	Zeleni kanal	0,34	0,41	3
<i>Shigella flexneri</i>	Crveni kanal	0,22	0,30	3
	Plavi kanal	0,14	0,25	6
	Zeleni kanal	0,25	0,27	2
<i>Listeria monocytogenes</i>	Crveni kanal	0,23	0,29	2
	Plavi kanal	0,24	0,26	2
	Zeleni kanal	0,24	0,27	3
<i>Staphylococcus aureus</i>	Crveni kanal	0,37	0,64	2
	Plavi kanal	0,31	0,37	3
	Zeleni kanal	0,34	0,64	2
<i>Bacillus subtilis</i>	Crveni kanal	0,33	0,39	2
	Plavi kanal	0,37	0,40	1
	Zeleni kanal	0,35	0,39	2
<i>Enterococcus faecalis</i>	Crveni kanal	0,35	0,40	2
	Plavi kanal	0,36	0,39	1
	Zeleni kanal	0,35	0,39	1

5. ZAKLJUČAK

U okviru ove disertacije ispitivana su hemijska, antioksidativna i antimikrobna svojstva srpskog propolisa primenom različitih hromatografskih, spektroskopskih, elektrohemijskih i multivarijantnih hemometrijskih metoda.

Do sada se smatralo da Evropski propolis pripada propolisu topola tipa, koji je jedinstven za područje Severne Amerike, Azije, Evrope i Novog Zelanda. Na osnovu vizuelnog posmatranja dobijenih HPTLC hromatograma srpskog propolisa mogu se uočiti dva botanički različita tipa propolisa. Uzorci koji sadrže oranž, žute i zelene zone klasifikovani su kao uzorci oranž tipa, dok su uzorci koji sadrže plave i zelene zone klasifikovani kao uzorci plavog tipa propolisa. Poređenjem srpskog sa propolisima iz regiona i nemačkim propolisom uočena je sličnost koja ukazuje na isto botaničko poreklo. U okviru ove disertacije razvijen je postupak za pripremu slike pre primenu multivarijantne analize na istu. Multivarijantne klasifikacione metode primenjene na slike HPTLC hromatograma srpskog, hrvatskog, slovenačkog i nemačkog propolisa potvrđuju rezultate dobijene vizuelnim ispitivanjem. Uočeno je da uzorci koji su klasifikovani kao oranž tip sadrže kofeinsku kiselinu, krisin, kempferol, kvercetin u većoj količini u odnosu na uzorke koji pripadaju plavom tipu propolisa. Jedinjenja koja prema HPTLC profilu daju plave zone karakteristične za plavi tip srpskog propolisa su naringenin, galangin, pinocembrin i fenolne kiseline. Sedamdeset pet fenolnih jedinjenja je identifikovano u oba tipa srpskog propolisa primenom ultraefikasne tečne hromatografije kuplovane sa linearnim jon trap-Orbitrap hibridnim masenim analizatorom. Prema našim saznanjima, osam fenolnih jedinjenja (šest fenolnih glicerida, jedan glikozid i jedan flavanonol) je identifikovano prvi put u propolisu. Iako se do skora smatralo da pčele prilikom proizvodnje propolisa hidrolizuju glikozide, u srpskom propolisu su identifikovana četiri glikozida, od toga apigetrin prvi put. Uzorci klasifikovani kao oranž tip propolisa sadrže veće količine deset fenola koji su kvantifikovani, izuzev narangina koji je kvantifikovan u plavom tipu propolisa. Fenoli kao što su galangin (4,48 – 41,20 mg/g u oranž tipu, 0,17-14,30 mg/g u plavom tipu propolisa), krisin (1,39-16,84 mg/g u oranž tipu propolisa, LOD-6,99 mg/g u

plavom tipu propolisa), pinocembrin (0,81-8,91 mg/g u oranž tipu propolisa, LOD-3,49 mg/g u plavom tipu propolisa) karakteristični za topola tip propolisa su prisutni u znatno većoj količini u oranž tipu propolisa. Analiza glavnih komponenata primenjena na kvantifikovane količine deset fenolnih jedinjenja verifikuje prisustvo dva tipa propolisa. Ispitivanjem nemačkog propolisa može se uočiti sličnost sa srpskim i postojanje dva podtipa propolisa. Multivarijantne metode potvrđuju prisustvo dva tipa nemačkog propolisa primenjene na masene signale dobijene direktnom analizom u realnom vremenu.

Vizuelnim ispitivanjem UV/VIS spektara i cikličih voltamograma srpskog propolisa uočena je razlika između uzoraka oranž i plavog tipa propolisa. Multivarijantna analiza primenjena na UV/VIS spektre i ciklične voltamograme takođe potvrđuje prisustvo dva tipa propolisa. Poređenjem sadržaja ukupnih fenola, odnosno flavonoida oba tipa propolisa ustanovljeno je da je oranž tip propolisa ima veći sadržaj fenolnih jedinjenja od plavog tipa propolisa. U prilog ovome govori i veći antioksidativni kapacitet oranž propolisa u poređenju sa plavim. Korelacijom antioksidativne aktivnosti i ukupnih fenola potvrđen je doprinos fenolnih jedinjenja antioksidativnoj aktivnosti propolisa.

Intenzitet struje kao parametar koji se može dovesti u vezu sa sadržajem fenolnih jedinjenja kod uzoraka koji su klasifikovani kao plavi tip propolisa pokazuje značajno niži opseg od uzoraka klasifikovanih kao oranž tip propolisa. Na osnovu ovih rezultata se može zaključiti da oranž tip propolisa ima veći sadržaj fenolnih jedinjenja. Na osnovu vrednosti elektrodnog potencijala plavog i oranž propolisa, nameće se zaključak da se uzorci koji pripadaju oranž tipu propolisa lakše oksiduju tj. pokazuju veći antioksidativni kapacitet. Površina Q_{700} plavog propolisa je manja od površine oranž propolisa, što ukazuje na veću antioksidativnu moć oranž propolisa.

Na osnovu količine esencijalnih i toksičnih elemenata, srpski propolis se može podeliti u tri grupe. Metali kao što su Al, Ca, Fe, K, Mg, Zn i metaloid Si su prisutni u koncentraciji većoj od 150 mg/kg. Sadržaj metala Ba, Cu, Na, Pb, Sr i metaloid B varira od 2,07 do 41,38 mg/kg. Metali kao što su Cd, Cr, Co, Mo, Ni, V i metaloid As su prisutni u jako maloj koncentraciji ili u tragovima. Živa nije detektovana u ispitivanim uzorcima. Srednja vrednost sadržaja Pb i Cd u ispitivanim uzorcima srpskog propolisa iznosi 7,84

mg/kg i 0,18 mg/kg, respektivno, što je, prema kriterijumima Svetske zdravstvene organizacije, bezbedno za humanu upotrebu.

Ispitivanje antimikrobnog dejstva odabranih uzoraka srpskog propolisa je pokazalo da su bakterije sojeva *B. subtilis*, *E. faecalis*, *S. Aureus*, *L. monocytogenes*, *A. hydrophila* i *S. Flexneri* jako osetljive na njih. Ovi najosetljiviji sojevi bakterija su dalje korišćeni u ispitivanju antimikrobne aktivnosti ekstrakata propolisa korišćenjem MIC eseja. Na osnovu dobijenih rezultata se može predložiti primena propolisa kao prirodnog antibiotika protiv gore navedenih patogena hrane. U okviru ove teze je dokazano da je antimikrobni efekat ispitivanog srpskog propolisa izraženiji prema Gram-pozitivnim nego prema Gram-negativnim bakterijama. Poređenjem fenolnog HPTLC profila i bioautografske analize propolisa utvrđeno je da su fenoli krizin, kvercetin, kaempferol, *p*-kumarinska i kafeinska kiselina odgovorni za antimikrobni efekat ekstrakata propolisa na prethodno navedene sojeve bakterija.

Na osnovu dobijenih rezultata može se zaključiti da srpski propolis pripada evropskom propolisu. Takođe, može se zaključiti da postoje dva podtipa Evropskog propolisa topola tipa, što je u suprotnosti sa dosadašnjim mišljenjem da nema značajne razlike između uzoraka Evropskog propolisa.

6. REFERENCE

1. Choma I. M., Grzelak E. M., Bioautography detection in thin-layer chromatography. *Journal of Chromatography A*, (2011) 1218 (19): 2684-91.
2. Toreti V. C., Recent progress of propolis for its biological and chemical compositions and its botanical origin. *Evidence-Based Complementary and Alternative Medicine*, (2013): 1-13.
3. Marcucci M. C., Propolis: chemical composition, biological properties and therapeutic activity. *Apidologie*, (1995) 26: 83-99.
4. Bogdanov S., Bankova V., *The Propolis Book*, (2012), Bee hexagon.
5. Crane E., *The world history of beekeeping and honey hunting*, (1999), Gerald Duckworth & Co Ltd; London.
6. Stanimirović Z., Vučinić M., *Medonosna pčela* (2000). Fakultet veterinarske medicine, Beograd.
7. Nedić N., Stanisavljević Lj., Pihler I., Kezić N., Bendixen C., Kryger P., Detecting population admixture in honey bees of Serbia. *Journal of Apicultural Research*, (2014) 53 (2): 303-313.
8. Milovanović I., Propolis, *Hemijski pregled*, (2006) 47 (1): 8-10.
9. Salatino A., Fernandes-Silva C. C., Righi A. A., Salatino M. L. F. Propolis research and the chemistry of plant products. *Natural Product Reports*, (2011) 28 (5): 925–936.
10. Tran V.H., Duke R.K, Abu-Mellal A, Duke C.C., Propolis with high flavonoid content collected by honey bees from *Acacia paradoxa*. *Phytochemistry*, (2012) 81:126-132.
11. Bogdanov S., Contaminants of bee products. *Apidologie*, (2006) 37: 1–18.
12. Custodio A.R., Ferreira M. M. C., Negri G., Salatino A., Clustering of Comb and Propolis Waxes Based on the Distribution of Aliphatic Constituents. *Journal of Brazilian Chememical Society*, (2003) 14 (3): 354-357.

13. Breed M., Garry M.F., Pearce A.N., Hibbard B.E., Bjostad L.B., Page R.E., The role of wax comb in honey bee nestmate recognition. *Animal Behaviour*, (1995) 50 (2): 489-496.
14. Chauzat P. M., Jean-Paul F., Pesticide residues in beeswax samples collected from honey bee colonies (*Apis mellifera* L.) in France. *Pest Management Science*, (2007) 63: 1100–1106.
15. Manach C., Scalbert A., Morand C, Rémésy C, Jiménez L., Polyphenols: food sources and bioavailability. *The American Journal of Clinical Nutrition*, (2004) 79 (5): 727-747.
16. Harborne J.B., Williams C.A., Advances in flavonoid research since 1992. *Phytochemistry*, (2000) 55 (6): 481-504.
17. Anklam E., A review of the analytical methods to determine the geographical and botanical origin of honey. *Food Chemistry*, (1998) 63 (4): 549-562.
18. Guo X., Chen B., Luo L., Zhang X., Dai X., Gong S., Chemical Compositions and Antioxidant Activities of Water Extracts of Chinese Propolis. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, (2011) 59 (23): 12610-12616.
19. Falcão S.I., Vale N., Gomes P., Domingues M.R, Freire C., Cardoso S.M., Vilas-Boas M., Phenolic Profiling of Portuguese Propolis by LC–MS Spectrometry: Uncommon Propolis Rich in Flavonoid Glycosides. *Phytochemical Analysis*, (2013) 24 (4): 309-318.
20. Bogdanov S., Propolis : Composition, Health, Medicine, (2012) (January): 1–35.
21. Meresta T., Changes in the antibacterial activity pattern of propolis extracts during long storage *Medycyna weterynaryjna*, (1997) 53 (5): 277-278.
22. Stepanović S., Antić A., Dakić I., Švabić-Vlahović M., In vitro antimicrobial activity of propolis and synergism between propolis and antimicrobial drugs, *Microbiological Research*, (2003) 158 (4): 353–357.
23. Pietta P. G., Flavonoids as Antioxidants. *Journal of Natural Products*, (2000) 63 (7): 1035-1042.
24. Bankova V., Chemical diversity of propolis and the problem of standardization, *Journal of Ethnopharmacology*, (2005) 100 (1-2): 114–7.

25. Miller, J.M., *Chromatography – Concepts and contrasts*, (2005) John Wiley & Sons and N.J. Hoboken,.
26. Morlock, G., Schwack W., Hyphenations in planar chromatography. *Journal of Chromatography A*, (2010) 1217 (43): 6600-6609.
27. Milojković-Opsenica D., Andrić F., (2013) High Performance Thin-Layer Chromatography, In: *Green Chromatographic Techniques*, Inamuddin and Mohammad Luqman (Editors), Springer, 81-101.
28. Milojković-Opsenica D., Ristivojević P., Andrić F., Trifković J., Planar Chromatographic Systems in Pattern Recognition and Fingerprint Analysis. *Chromatographia*, (2013) 76 (19-20): 1239-1247.
29. Milojković-Opsenica D., Sorbenti u hromatografiji na tankom sloju, *Hemijski pregled*, Beograd, (2000) 41 (2): 38-43
30. Jork H., Fischer W., Wimmer H., *Thin-Layer Chromatography: Reagents and Detection Methods*, (1994), VCH Verlagsgesellschaft MBH,
31. Dass C., *Principles and practice of biological mass spectrometry*, (2001) Editor: N.Y.J. Wiley.
32. Hoffmann E.D., Strooband V., *Mass Spectrometry: Principles and Applications*, 3rd Edition, (2007), Wiley, N.Y.
33. Chernetsova E., Morlock E.G., Ambient desorption ionization mass spectrometry (DART, DESI) and its bioanalytical applications. *Bioanalytical Reviews*, (2011) 3 (1): 1-9.
34. Hajslova J., Cajka, T., Vaclavik L., Challenging applications offered by direct analysis in real time (DART) in food-quality and safety analysis. *TrAC Trends in Analytical Chemistry*, (2011) 30 (2): 204-218.
35. Perry R.H., Cooks R.G., R.J. Noll, Orbitrap mass spectrometry: Instrumentation, ion motion and applications. *Mass Spectrometry Reviews*, (2008) 27 (6): 661-699.
36. de Rijke E., Out P., Niessen W. M., Ariese F., Gooijer C., Brinkman U.A., Analytical separation and detection methods for flavonoids. *Journal of Chromatography A*, (2006) 1112 (1–2): 31-63.

37. Medana C., Carbone F., Aigotti R., Appendino G., Baiocchi C., Selective Analysis of Phenolic Compounds in Propolis by HPLC-MS / MS. *Phytochemical Analysis*, (2008) 39: 32–39.
38. Rustan N.I., de Hoffmann E., Quetin-Leclercq J., Determination of flavone, flavonol, and flavanone aglycones by negative ion liquid chromatography electrospray ion trap mass spectrometry. *Journal of the American Society for Mass Spectrometry*, (2001) 12 (6): 707-715.
39. Domon B., Costello C.E., A systematic nomenclature for carbohydrate fragmentations in FAB-MS/MS spectra of glycoconjugates. *Glycoconjugate Journal* (1988) 5: 397-409.
40. Mabry T.J., Markham K.R., Thomas M.B., *The Systematic Identification of Flavonoids*. (1970) Wiley, N.Y.
41. Singleton V.L., Rossi J.A., Colorimetry of total phenolics with phosphomolybdic phosphotungstic acid reagents. *American Society for Enology and Viticulture*, (1965) 16: 144-158.
42. Everette J.D., Everette J.D., Bryant Q.M., Green A.M., Abbey Y.A., Wangila G.W., Walker R.B., Thorough Study of Reactivity of Various Compound Classes toward the Folin–Ciocalteu Reagent. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, (2010) 58 (14): 8139-8144.
43. Salatino A., Woisky R.G., Analysis of propolis: some parameters and procedures for chemical quality control. *Journal of Apicultural Research*, (1998) 37 (2): 99-105.
44. Karadag A., Ozcelik B., Saner S., Review of Methods to Determine Antioxidant Capacities. *Food Analytical Methods*, (2009) 2 (1): 41-60.
45. Cimpoi, C., Analysis of Some Natural Antioxidants by Thin-Layer Chromatography and High Performance Thin-Layer Chromatography, *Journal of Liquid Chromatography and Relative Technology*. (2006), 29, 1125-1142.
46. Brand-Williams W., Cuvelier M. E., Berset C., Use of a free radical method to evaluate antioxidant activity. *LWT - Food Science and Technology* (1995) 28, 25-30.

47. Stanković D.M., Primena metil-3,5-bis[(di(2-pikolil)amino)metil]benzoata za modifikaciju elektrode od staklastog ugljenika. Doktorska disertacija, Hemijski fakultet, Beograd. (2012).
48. Kilmartin P., Characterisation of polyphenols in green, oolong, and black teas, and in coffee, using cyclic voltammetry. *Food Chemistry*, (2003), 82: 501–512.
49. Laskar, R.A., et al., Antioxidant activity of Indian propolis and its chemical constituents. *Food Chemistry*, (2010) 122 (1): 233-237.
50. Buratti S., S. Benedetti, Cosio M.S., Evaluation of the antioxidant power of honey, propolis and royal jelly by amperometric flow injection analysis. *Talanta*, (2007) 71 (3): 1387-1392.
51. Rebiai T.L., Belfar M.L., In vitro Evaluation of Antioxidant Capacity of Algerian Propolis by Spectrophotometrical and Electrochemical Assays. *International Journal of pharmacology*, (2011) 7 (1):113-118.
52. Pigani L., Foca G., Ulrici A., Ionescu K., Martina V., Terzi F., Vignali M., Zanardi C., Seeber R., Classification of red wines by chemometric analysis of voltammetric signals from PEDOT-modified electrodes. *Analytica Chimica Acta*, (2009) 643 (1–2): 67-73.
53. Hill, S.J., Inductively Coupled Plasma Spectrometry and its Applications, (2006), 2nd Edition, Wiley.
54. Cvek J., Medic-Saric M., Vitali D., Vedrina-Dragojevic I., Smit Z., Tomic S., The content of essential and toxic elements in Croatian propolis samples and their tinctures. *Journal of Apicultural Research*, (2012) 47 (1): 35-45.
55. Rios J.L., Recio M.C, Villar A., Screening methods for natural products with antimicrobial activity: A review of the literature. *Journal of Ethnopharmacology*, (1988) 23 (2–3): 127-149.
56. Irena M., Choma I., Thin-layer chromatography hyphenated with bioassays. *Journal of AOAC International*, (2013) 96 (6): 1165-6.
57. Marston A., Thin-layer chromatography with biological detection in phytochemistry. *Journal of Chromatography A*, (2011) 1218 (19): 2676-2683.
58. Brereton, R.G., Chemometrics for Pattern Recognition, N.Y.J. (2009) Wiley.

59. Brereton, R.G., *Applied Chemometrics for Scientists*, (2007) Wiley.
60. Trifković J.Đ. Određivanje kvantitativnog odnosa strukture i retencije arilpiperazina primenom tečne hromatografije i multivarijantnih hemometrijskih metoda. Doktorska disertacija, Hemijski fakultet, Beograd (2013).
61. Sandra Šegan, Korelacija strukture i retencije steroidnih tetraoksana primenom tankoslojne hromatografije i multivarijantnih hemometrijskih metoda, Doktorska disertacija, Hemijski fakultet, Beograd (2013).
62. Zieliński Ł., Deja S., Jasicka-Misiak I., Kafarski P., Chemometrics as a Tool of Origin Determination of Polish Monofloral and Multifloral Honeys. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, (2014) 62: 2973–2981.
63. Andrić F. Lj., Određivanje podeonih koeficijenata i solvatohromnih parametara malih organskih molekula primenom tankoslojne hromatografije i hemometrije, Doktorska disertacija, Hemijski fakultet, Beograd (2014).
64. Berrueta L.A., Alonso-Salces R.M., Héberger K., Supervised pattern recognition in food analysis. *Journal of Chromatography A*, (2007) 1158 (1–2): 196–214.
65. Ristivojević P., Andrić F. Lj., Trifković J. Đ., Vovk I., Stanisavljević Lj. Ž., Tešić Ž. Lj., Milojković-Opsenica D. M., Pattern recognition methods and multivariate image analysis in HPTLC fingerprinting of propolis extracts. *Journal of Chemometrics*, (2014) 28 (4): 301–310.
66. Giansante L., Di Vincenzo, D., Bianchi G., Classification of monovarietal Italian olive oils by unsupervised (PCA) and supervised (LDA) chemometrics. *Journal of the Science of Food and Agriculture*, (2003) 83 (9): 905–911.
67. Wong K.H., Razmovski-Naumovski V., Li K.M., Li G.Q., Chan K., Differentiating *Puerariae Lobatae Radix* and *Puerariae Thomsonii Radix* using HPTLC coupled with multivariate classification analyses. *Journal of Pharmaceutical and Biomedical Analysis*, (2014) 95: 11–19.
68. Kumazawa S., Hamasaka T., Nakayama T., Antioxidant activity of propolis of various geographic origins. *Food Chemistry*, (2004) 84(3): 329–339.

69. Sârbu C., Moț A.C., Ecosystem discrimination and fingerprinting of Romanian propolis by hierarchical fuzzy clustering and image analysis of TLC patterns. *Talanta*, (2011) 85 (2), 1112–1117.
70. Medić-Šarić M.B., Rastija V., Cvek J., Polyphenolic Profiling of Croatian Propolis and Wine. *Food Technology Biotechnology* (2013) 51 (2): 159–170.
71. Kunz N., Schroeder I.S.A., Morlock G.E., Planar-chromatographischer Fingerabdruck von deutschem Propolis, in Poster auf der AG der Institute für Bienen- forschung. 2011.
72. Bertrams J., Kunz N., Müller M., Kammerer D., Conrad Stintzing F., Phenolic compounds as marker compounds for botanical origin determination of German propolis samples based on TLC and TLC-MS. *Journal of Applied Botany and Food Quality*, (2013) 86: 143 - 153.
73. Morlock G. E., Ristivojevic P., Chernetsova E. S., Combined multivariate data analysis of high-performance thin-layer chromatography fingerprints and direct analysis in real time mass spectra for profiling of natural products like propolis. *Journal of Chromatography. A*, (2014) 1328: 104–12.
74. Ristivojević P., Trifković J., Gašić U., Andrić F., Nedić N., Tešić Ž, Milojković-Opsenica D., Ultra-high performance liquid chromatography-mass spectrometry (UHPLC–LTQ OrbiTrap MS/MS) study of phenolic profile of Serbian poplar type propolis. *Phytochemical analysis*, (2014) Article in press.
75. Gardana C., Scaglianti M., Pietta P., Simonetti P., Analysis of the polyphenolic fraction of propolis from different sources by liquid chromatography–tandem mass spectrometry. *Journal of Pharmaceutical and Biomedical Analysis*, (2007) 45 (3): 390-399.
76. Pellati F., Orlandini G., Pinetti D., Benvenuti S., HPLC-DAD and HPLC-ESI-MS/MS methods for metabolite profiling of propolis extracts. *Journal of Pharmaceutical and Biomedical Analysis*, (2011) 55 (5): 934–948.
77. Kečkeš S, Gašić U., Veličković T.Ć., Milojković-Opsenica D., Natić M., Tešić B.Ž., The determination of phenolic profiles of Serbian unifloral honeys using ultra-

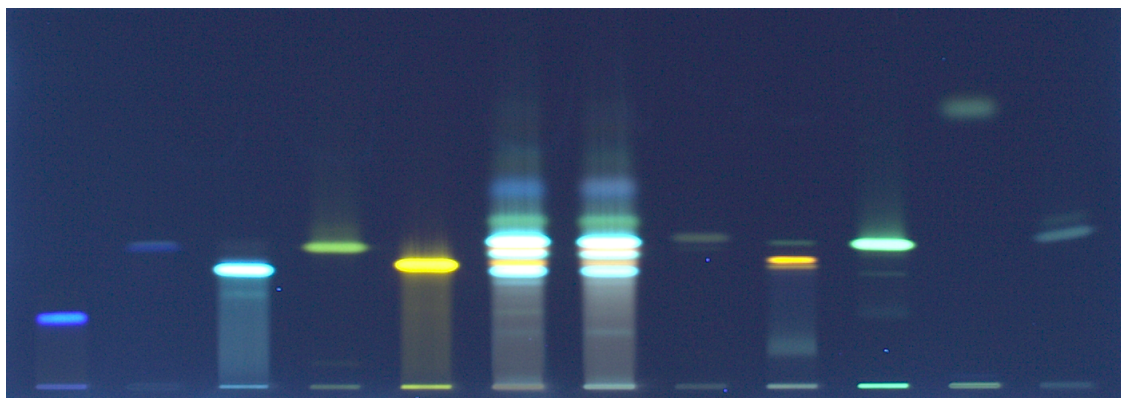
- high performance liquid chromatography/high resolution accurate mass spectrometry. *Food Chemistry*, (2013) 138: 32-40.
78. Weisz G.M., Kammerer D.R., Carle R., Identification and quantification of phenolic compounds from sunflower (*Helianthus annuus* L.) kernels and shells by HPLC-DAD/ESI-MSⁿ. *Food Chemistry*, (2009) 115 (2): 758-765.
79. Fabre N., Rustan I., de Hoffmann E., Quetin-Leclercq J., Determination of flavone, flavonol, and flavanone aglycones by negative ion liquid chromatography electrospray ion trap mass spectrometry. *Journal of the American Society for Mass Spectrometry*, (2001) 12 (6): 707-715.
80. Wang D., Lu J., Miao A., Xie Z., Yang D., HPLC-DAD-ESI-MS/MS analysis of polyphenols and purine alkaloids in leaves of 22 tea cultivars in China. *Journal of Food Composition and Analysis*, (2008) 21 (5): 361-369.
81. Wang Y., Yang L., He Y.Q., Wang C.H., Welbeck E.W., Bligh S.W., Characterization of fifty-one flavonoids in a Chinese herbal prescription Longdan Xiegan Decoction by high-performance liquid chromatography coupled to electrospray ionization tandem mass spectrometry and photodiode array detection. *Rapid Communications in Mass Spectrometry*, (2008) 22 (12): 1767-1778.
82. Svensson L., Sekwati-Monang B., Lutz D.L., Schieber A., Gänzle M. G., Phenolic Acids and Flavonoids in Nonfermented and Fermented Red Sorghum (*Sorghum bicolor* (L.) Moench). *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, (2010) 58 (16): 9214-9220.
83. Gašić U., Kečkeš S., Dabić D., Trifković J., Milojković-Opsenica D., Natić M., Tešić Ž., Phenolic profile and antioxidant activity of Serbian polyfloral honeys. (2014) *Food Chemistry*, 145, 599-607.
84. Zheng G.D., Guo-Dong Z., Zhou P., Yang H., Yue-shan L., P. Li, E.-Hu L. Rapid resolution liquid chromatography-electrospray ionisation tandem mass spectrometry method for identification of chemical constituents in *Citri Reticulatae* Pericarpium. *Food Chemistry*, (2013) 136 (2): 604-611.

85. Lévêques A., Actis-Goretta L., Rein M.J., Williamson G., Dionisi F., Giuffrida F. UPLC–MS/MS quantification of total hesperetin and hesperetin enantiomers in biological matrices. *Journal of Pharmaceutical and Biomedical Analysis*, (2012) 57: 1-6.
86. Bankova V., Popova M., Bogdanov S., Sabatini A.G., Chemical composition of European propolis: expected and unexpected results. *Z Naturforsch C*, (2002) 57 (5-6): 530-533.
87. Zhang CP, L.G., Hu FL, Hydrolysis of flavonoid glycosides by propolis β -glycosidase. *Nat Prod Res*, (2012). 26(3): 270-273.
88. Hossain M.B., Rai D.K., Brunton N.P., Martin-Diana A.B., Barry-Ryan C., Characterization of Phenolic Composition in Lamiaceae Spices by LC-ESI-MS/MS. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, (2010) 58 (19): 10576-10581.
89. Isidorov V.A, Szczepaniak L., Bakier S., Rapid GC/MS determination of botanical precursors of Eurasian propolis. *Food Chemistry*, (2014) 142: 101-106.
90. Popova M., Silici S., Kaftanoglu O., Bankova V., Antibacterial activity of Turkish propolis and its qualitative and quantitative chemical composition. *Phytomedicine : International Journal of Phytotherapy and Phytopharmacology*, (2005) 12 (3): 221-228.
91. Ma C., Xiao S., Li Z., Wang W., Du L., Characterization of active phenolic components in the ethanolic extract of *Ananas comosus* L. leaves using high-performance liquid chromatography with diode array detection and tandem mass spectrometry. *Journal of Chromatography. A*, (2007) 1165 (1-2):39–44.
92. Ahn, M., Kumazawa, S., Usui, Y., Nakamura, J., Matsuka, M., Zhu, F., Nakayama, T., Antioxidant activity and constituents of propolis collected in various areas of China. *Food Chemistry*, (2007), 101 (4): 1383–1392.
93. Schroeder A., Wendt D., The antioxidant activity of German propolis-the effect of polyphenols and flavonids. Sixth EurBee Congress, Murcia, Spain, from 9th to 11th September 2014.
94. Russo A., Longo R., Vanella A., Antioxidant activity of propolis : role of caffeic acid phenethyl ester and galangin. *Trends in Biochemical Sciences*, (2002) 1: 21–29.

95. Hamasaka T. H., Umazawa S. K., Ujimoto T. F., Akayama T. N. Antioxidant Activity and Constituents of Propolis Collected in Various Areas of Japan, (2004) 101: 86–92.
96. Gong, S, Gong S., Luo L., Gong W., Gao, Y. Xie M.. Multivariate analyses of element concentrations revealed the groupings of propolis from different regions in China. Food Chemistry, (2012) 134 (1): 583-588.
97. Finger D., Filho I.K., Torres Y.R., Quináia S.P., Propolis as an Indicator of Environmental Contamination by Metals. Bulletin of Environmental Contamination and Toxicology, (2014) 92 (3): 259-264.
98. Bonvehí J.S., Bermejo F.J.O., Element content of propolis collected from different areas of South Spain. Environmental Monitoring and Assessment, (2013) 185 (7): 6035-6047.
99. Katircioglu H., Mercan N., Antimicrobial activity and chemical compositions of Turkish propolis from different region. African Journal of Biotechnology (2006) 5 (11): 1151-1153.
100. Pepeljnjak S., Kosalec I., Galangin expresses bactericidal activity against multiple-resistant bacteria: MRSA, *Enterococcus* spp. and *Pseudomonas aeruginosa*. FEMS Microbiology Letters (2004) 240: 111–116.
101. Mercan N., Kivrak I., Duru M. E., Katircioglu H., Gulcan S., Malci S., Acar G., Salih B., Chemical composition effects onto antimicrobial and antioxidant activities of propolis collected from different regions of Turkey. Annals of Microbiology (2006) 56 (4): 373-378.
102. Probst I.S., Sforcin, J.M., Rall. V.L.M., Fernandes A.A.H., Fernandes J.A., Antimicrobial activity of propolis and essential oils and synergism between these natural products. Journal of *Venomous Animals and Toxins* including Tropical Diseases, (2011) 17 (2): 159-167.
103. Gatto M. T., Falcocchio S., Grippa E., Mazzanti G., Battinelli L., Nicolosi G., Saso L., Antimicrobial and Anti-Lipase Activity of Quercetin and its C2-C16 3-O-acyl-esters, (2002) 10: 269–272.

104. Rodríguez Vaquero, M. J., Alberto, M. R., & Manca de Nadra, M. C., Influence of phenolic compounds from wines on the growth of *Listeria monocytogenes*. *Food Control*, (2007) 18 (5), 587–593.
105. Vijay Kothari, Madhu Naraniwal, Ankit Gupta, Effect of certain phytochemicals on *Aeromonas hydrophila*, *Research in biotechnology* (2011) 1 (2):20-25.
106. Amir Tukmechi, Abdolghaffar Ownagh, Ali Mohebbat, *In vitro* antibacterial activities of ethanol extract of iranian propolis (EEIP) against fish pathogenic bacteria (*Aeromonas hydrophila*, *Yersinia ruckeri*, *Streptococcus iniae*), *Braz J Microbiol* (2010) 41 (4): 1086–1092.
107. Taguri T., Tanaka T., Kouno I., Antibacterial Spectrum of Plant Polyphenols and Extracts Depending upon Hydroxyphenyl Structure, *Biological and Pharmaceutical Bulletin* (2006) 29 (11): 2226-2235.
108. Toit K.D., Buthelezi S., Bodenstein J., Anti-inflammatory and antibacterial profiles of selected compounds found in South African propolis, (2009) (November/December), 470–472.
109. Puupponen-Pimia R., Nohynek L., Meier C., Kähkönen M., Heinonen M., Hopia A., Oksman-Caldentey K.M., Antimicrobial properties of phenolic compounds from berries, *Journal of Applied Microbiology* (2001) 90: 494-507.

7. PRILOG



Slika 1. Fenolna jedinjenja (galna kiselina, *p*-kumarinska kiselina, kofeinska kiselina, apigenin, luteolin, naringenin, kvercetin, kempferol, pinostrobin, pinobaksin)

Tabela T1. Spisak uzoraka propolisa sa lokacijom, sadržajem voska i klasifikacijom prema HPTLC studiji

Broj uzoraka	Lokacija	Lokacija	Masa ispitivanog uzorka (g)	Nerastvorni ostatak u g	Klasifikacija prema HPTLC metodi
1	Zapadni region – Srbija	Zlatibor	1.01	0.62	Oranž
2	Istočni region – Srbija	Petrovac na Mlavi	1.17	0.46	Plavi
3	Centralni region – Srbija	Kragujevac	1.05	0.33	Oranž
4	Zapadni region – Srbija	Koceljeva	1	0.29	Plavi
3	Zapadni region – Srbija	Koceljeva	1.01	0.28	Plavi
6	Južni region – Srbija	Leskovac	1.01	0.34	Oranž
7	Istočni region – Srbija	Homolje	1.01	0.26	Oranž
8	Istočni region – Srbija	Kamenovo	1.01	0.25	Oranž
9	Vojvodina – Srbija	Vršачki Ritovi	1.02	0.29	Oranž
10	Centralni region – Srbija	Mali Jastrebac	1.09	0.3	Oranž
11	Vojvodina – Srbija	Sombor	1.02	0.3	Oranž
12	Istočni region – Srbija	Banat	1.02	0.39	Oranž
13	Zapadni region – Srbija	Cer	1.01	0.25	Oranž
14	Beogradski region – Srbija	Beogradski	1.18	0.34	Oranž
13	Vojvodina – Srbija	Odžaci	0.99	0.35	Plavi
16	Vojvodina – Srbija	Subotica	1.01	0.39	Oranž
17	Vojvodina – Srbija	Subotica	1.04	0.47	Oranž
18	Vojvodina – Srbija	Kelebija	0.95	0.35	Plavi
19	Vojvodina – Srbija	Fruška Gora	1.02	0.32	Oranž
20	Zapadni region – Srbija	Lajkovac	1	0.36	Oranž
21	Centralni region – Srbija	Arandjelovac	1.01	0.39	Oranž
22	Južni region – Srbija	Surdulica	1.01	0.27	Oranž
23	Južni region – Srbija	Surdulica	1.02	0.33	Plavi
24	Južni region – Srbija	Vladičin Han	1.01	0.23	Oranž
23	Južni region – Srbija	Vladičin Han	1.03	0.3	Oranž
26	Južni region – Srbija	Vladičin Han	0.99	0.19	Oranž
27	Južni region – Srbija	Vladičin Han	1.01	0.13	Oranž
28	Vojvodina – Srbija	Bačka Topola	1.04	0.22	Oranž
29	Vojvodina – Srbija	Begeč	1	0.42	Oranž

30	Vojvodina – Srbija	Fruška Gora	1.02	0.2	Oranž
31	Vojvodina – Srbija	Karlovc	0.98	0.52	Oranž
32	Vojvodina – Srbija	Banstol	1.08	0.57	Oranž
33	Južni region – Srbija	Vučje	1.07	0.32	Oranž
34	Južni region – Srbija	Kopašnica	1.04	0.31	Oranž
35	Hrvatska	Subotica	1.12	0.2	Oranž
36	Centralni region – Srbija	Kraljevo	1.05	0.3	Oranž
37	Zapadni region – Srbija	Valjevo	1.03	0.1	Oranž
38	Vojvodina – Srbija	Varvarin	1.39	0.35	Oranž
39	Beogradski region – Srbija	Grocka	1.09	Without wax	Plavi
40	Istočni region – Srbija	Runjkovac	1.05	0.16	Oranž
41	Južni region – Srbija	Vučje	1.04	0.41	Oranž
42	Centralni region – Srbija	Brus	1.02	0.23	Oranž
43	Centralni region – Srbija	Brus	1	0.49	Oranž
44	Kosovo and Metohija – Srbija	Šar planina	1.04	0.12	Oranž
43	Kosovo and Metohija – Srbija	Šar planina	1	0.31	Oranž
46	Kosovo and Metohija – Srbija	Šar pplanina	1.08	0.17	Oranž
47	Kosovo and Metohija – Srbija	Šar planina	1.03	0.18	Oranž
48	Istočni region – Srbija	Kraljevo	1.07	0.17	Plavi
49	Zapadni region – Srbija	Valjevo	1.02	0.29	Oranž
30	Centralni region – Srbija	Krusevac	1.03	0.3	Oranž
31	Zapadni region – Srbija	Valjevo	1.01	0.35	Oranž
52	Zapadni region – Srbija	Valjevo	1.04	0.34	Plavi
53	Centralni region – Srbija	Kragujevac	0.66	0.2	Plavi

Tabela T2. Rezultati testa za određivanje osetljivosti testiranih uzoraka dobijena disk difuzionom metodom.

	mg/ml	<i>Listeria monocytogenes</i> ATCC19111	<i>Micrococcus luteus</i> ATCC7468	<i>Staphylococcus aureus</i> ATCC23023	<i>Bacillus subtilis</i> ATCC6633	<i>Enterococcus faecalis</i> ATCC29212	<i>Streptococcus equisimilis</i> ATCC12394
P1	79,22	++	++	+	+++	+++	++
	39,61	++	++	+	+++	+++	++
	19,80	+	+	-	++	++	++
	9,90	+	-	-	++	+	+
	4,93	+	-	-	++	+	+
	2,47	+	-	-	+	+	-
	1,24	-	-	-	-	-	-
	0,62	-	-	-	-	-	-
P2	133,36	+++	++	++	+++	+++	++
	77,68	++	++	++	+++	+++	++
	38,84	++	++	+	+++	++	++
	19,42	+	+	+	+++	+	++
	9,71	+	-	+	++	+	+
	4,83	+	-	+	+	+	+
	2,43	+	-	-	-	-	+
	1,21	+	-	-	-	-	+
P3	147,14	+	+	++	+	+++	+
	73,37	+	+	++	+	++	+
	36,78	+	+	++	+	++	+
	18,39	+	+	++	-	++	+
	9,20	+	+	+	-	++	+
	4,40	+	+	+	-	+	-
	2,30	+	-	-	-	+	-
	1,15	+	-	-	-	+	-
P4	142,00	+	+	++	++	+	+

	71,00	+	+	++	++	+	+
	33,30	+	+	++	++	+	+
	17,73	+	+	++	++	+	+
	8,87	+	+	+	+	-	-
	4,44	+	+	-	+	-	-
	2,22	+	-	-	+	-	-
	1,11	+	-	-	-	-	-
P5	146,36	+	+	+	+++	+	+
	73,28	+	+	+	+++	+	+
	36,64	+	+	+	++	+	+
	18,32	+	+	+	-	-	+
	9,16	+	+	+	-	-	-
	4,38	+	-	-	-	-	-
	2,29	+	-	-	-	-	-
	1,14	+	-	-	-	-	-
P6	134,68	++	+++	++	++	++	++
	67,34	++	+++	++	++	+	++
	33,67	++	+++	++	++	+	++
	16,83	+	++	+	+	+	+
	8,42	+	-	+	-	-	+
	4,21	+	-	-	-	-	-
	2,10	+	-	-	-	-	-
	1,03	+	-	-	-	-	-
P7	130,32	+++	+++	+++	+++	++	++
	73,26	+++	+++	++	++	++	++
	37,63	++	++	++	++	++	++
	18,81	++	++	++	++	++	+
	9,41	-	-	-	-	-	+
	4,70	-	-	-	-	-	-
	2,33	-	-	-	-	-	-
	1,17	-	-	-	-	-	-

P8	132,30	+++	++	+++	+++	++	+++
	76,23	+++	++	++	+++	++	++
	38,12	+++	+	++	++	++	++
	19,06	++	+	++	++	++	++
	9,33	+	-	-	-	-	+
	4,76	-	-	-	-	-	-
	2,38	-	-	-	-	-	-
	1,19	-	-	-	-	-	-
P9	147,14	+++	+++	+++	+++	++	+++
	73,37	+++	+++	++	+++	++	+++
	36,78	++	++	+	++	++	++
	18,39	++	-	-	++	++	+
	9,20	+	-	-	-	+	+
	4,40	-	-	-	-	-	-
	2,30	-	-	-	-	-	-
	1,15	-	-	-	-	-	-
P10	162,96	+++	-	+++	+++	+++	+++
	81,48	+++	-	+	+++	++	++
	40,74	+++	-	-	+++	++	++
	20,37	++	-	-	++	++	+
	10,18	++	-	-	+	+	+
	3,09	+	-	-	-	-	-
	2,35	-	-	-	-	-	-
	1,27	-	-	-	-	-	-
P11	143,18	+++	-	+++	+++	+++	+++
	72,39	++	-	++	+++	++	++
	36,29	++	-	+	++	++	++
	18,15	++	-	-	++	+	-
	9,07	+	-	-	+	+	-
	4,34	+	-	-	+	-	-
	2,27	-	-	-	-	-	-

	1,13	-	-	-	-	-	-
P12	127,32	++	-	++	++	++	+
	63,76	++	-	+	++	++	+
	31,88	++	-	-	++	+	-
	13,94	+	-	-	++	-	-
	7,97	-	-	-	+	-	-
	3,98	-	-	-	-	-	-
	1,99	-	-	-	-	-	-
	1,00	-	-	-	-	-	-
P15	127,30	+++	-	++	+++	+	+++
	63,63	++	-	+	+++	-	+
	31,82	+	-	-	++	-	+
	13,91	-	-	-	+	-	-
	7,94	-	-	-	+	-	-
	3,98	-	-	-	-	-	-
	1,99	-	-	-	-	-	-
	0,99	-	-	-	-	-	-
P16	124,78	+++	-	+++	+++	++	+
	62,39	+++	-	++	+++	++	+
	31,19	+++	-	+	+++	+	+
	13,40	++	-	-	+++	+	-
	7,80	+	-	-	++	-	-
	3,90	-	-	-	+	-	-
	1,95	-	-	-	-	-	-
	0,97	-	-	-	-	-	-
P17	117,62	+++	-	+++	+++	++	+
	38,81	+++	-	++	+++	++	+
	29,40	++	-	+	+++	++	+
	14,70	+	-	-	++	+	-
	7,33	+	-	-	++	+	-
	3,67	+	-	-	+	+	-

	1,84	-	-	-	-	-	-
	0,92	-	-	-	-	-	-
P19	141,26	+++	-	+++	+++	++	+
	70,63	+++	-	+	+++	++	+
	33,31	++	-	-	+++	+	+
	17,64	+	-	-	+++	-	-
	8,83	+	-	-	++	-	-
	4,41	-	-	-	+	-	-
	2,21	-	-	-	-	-	-
	1,10	-	-	-	-	-	-
P28	163,70	+++	-	+++	+++	+	-
	82,83	+++	-	++	+++	+	-
	41,42	++	-	-	+++	-	-
	20,71	++	-	-	++	-	-
	10,34	++	-	-	-	-	-
	3,18	+	-	-	-	-	-
	2,39	-	-	-	-	-	-
	1,29	-	-	-	-	-	-
P29	116,00	+++	-	++	+++	+	-
	38,00	+++	-	+	+++	+	-
	29,00	++	-	-	++	-	-
	14,30	+	-	-	+	-	-
	7,23	+	-	-	-	-	-
	3,62	+	-	-	-	-	-
	1,81	-	-	-	-	-	-
	0,91	-	-	-	-	-	-
P30	164,78	+++	-	+++	+++	++	-
	82,39	+++	-	++	++	++	-
	41,19	+++	-	+	+	++	-
	20,40	++	-	-	-	+	-
	10,30	++	-	-	-	+	-

P52	3,15	+	-	-	-	-	-	
	2,37	-	-	-	-	-	-	
	1,29	-	-	-	-	-	-	
	110,44	+++	-	++	+++	++	-	
	33,22	+++	-	+	+++	++	-	
	27,61	++	-	+	++	++	-	
	111,44	+	-	-	+	+	-	
	33,72	+	-	-	-	+	-	
	27,86	+	-	-	-	-	-	
P51	112,44	-	-	-	-	-	-	
	36,22	-	-	-	-	-	-	
	132,70	+++	-	+++	+++	+	-	
	66,33	+++	-	+++	++	-	-	
	33,17	++	-	++	+	-	-	
	16,39	++	-	-	-	-	-	
	8,29	++	-	-	-	-	-	
	4,15	-	-	-	-	-	-	
	2,07	-	-	-	-	-	-	
	1,04	-	-	-	-	-	-	
	0,32							
		<i>Aeromonas hydrophila</i> <i>ATCC 49140</i>	<i>Enterobacter cloacae</i> <i>ATCC 49141</i>	<i>Escherichia coli</i> <i>ATCC 23922</i>	<i>Proteus mirabilis</i> <i>ATCC 23933</i>	<i>Pseudomonas aeruginosa</i> <i>ATCC 13442</i>	<i>Salmonella enteritidis</i> <i>ATCC 13076</i>	<i>Shigella flexneri</i> <i>ATCC 9199</i>
P1	79,22	++	+	-	+	+	++	++
	39,61	++	+	-	+	+	++	++
	19,80	++	+	-	+	+	++	++
	9,90	++	+	-	+	+	+	++
	4,93	++	+	-	+	-	+	+
	2,47	+	+	-	-	-	-	-
	1,24	-	+	-	-	-	-	-
	0,62	-	+	-	-	-	-	-

P2	133,36	++	+	-	+	+	++	++
	77,68	++	+	-	+	+	++	++
	38,84	++	+	-	+	+	+	++
	19,42	++	+	-	+	+	+	++
	9,71	+	+	-	+	-	-	+
	4,83	+	+	-	-	-	-	+
	2,43	-	-	-	-	-	-	-
	1,21	-	-	-	-	-	-	-
P3	147,14	+	+	-	+	+	+	+
	73,37	+	+	-	+	+	+	+
	36,78	+	+	-	+	+	+	+
	18,39	+	+	-	-	+	+	+
	9,20	+	+	-	-	+	+	+
	4,40	+	+	-	-	-	-	-
	2,30	-	+	-	-	-	-	-
	1,15	-	+	-	-	-	-	-
P4	142,00	+	+	-	+	+	+	+
	71,00	+	+	-	+	+	+	+
	33,30	+	+	-	+	+	+	+
	17,73	+	+	-	-	+	+	+
	8,87	+	+	-	-	+	-	+
	4,44	-	+	-	-	-	-	-
	2,22	-	+	-	-	-	-	-
	1,11	-	+	-	-	-	-	-
P5	146,36	++	+	-	+	+	+	+
	73,28	++	+	-	+	+	+	+
	36,64	++	+	-	+	+	+	+
	18,32	+	+	-	-	+	+	+
	9,16	-	+	-	-	+	-	-
	4,38	-	+	-	-	-	-	-
	2,29	-	-	-	-	-	-	-

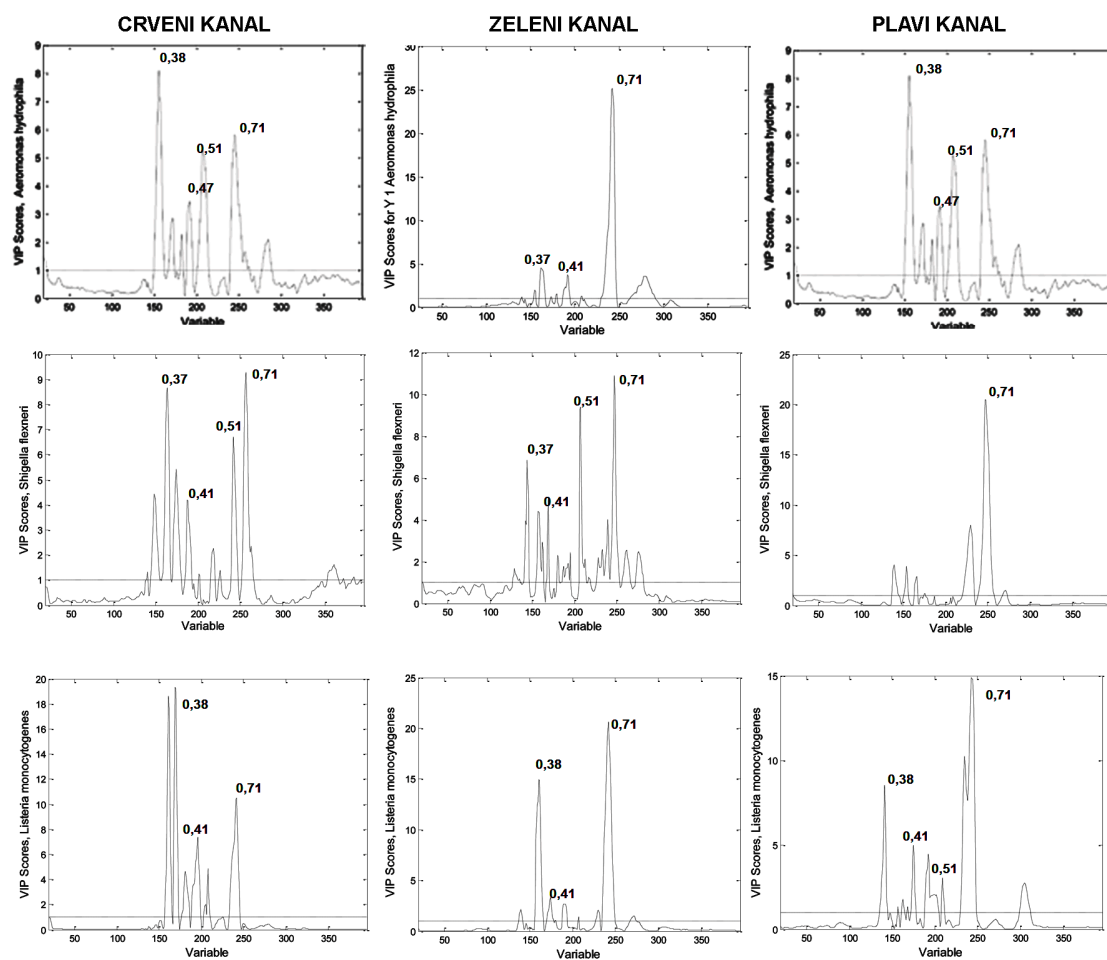
	1,14	-	-	-	-	-	-	-
P6	134,68	+++	+	-	+	+	+	+
	67,34	+++	+	-	+	+	+	+
	33,67	+++	+	-	+	+	+	+
	16,83	+++	+	-	-	+	+	+
	8,42	++	+	-	-	+	+	+
	4,21	-	+	-	-	+	-	+
	2,10	-	-	-	-	+	-	-
	1,03	-	-	-	-	-	-	-
P7	130,32	++	-	+	-	-	+	++
	73,26	++	-	++	-	-	+	++
	37,63	++	-	+	-	-	+	++
	18,81	++	-	+	-	-	+	++
	9,41	-	-	-	-	-	-	+
	4,70	-	-	-	-	-	-	-
	2,33	-	-	-	-	-	-	-
	1,17	-	-	-	-	-	-	-
P8	132,30	++	-	+	-	-	+	++
	76,23	++	-	++	-	-	+	++
	38,12	++	-	+	-	-	+	++
	19,06	+	-	+	-	-	+	++
	9,33	-	-	-	-	-	-	+
	4,76	-	-	-	-	-	-	-
	2,38	-	-	-	-	-	-	-
	1,19	-	-	-	-	-	-	-
P9	147,14	++	-	-	-	-	-	++
	73,37	++	-	-	-	-	-	++
	36,78	++	-	-	-	-	-	+
	18,39	++	-	-	-	-	-	+
	9,20	+	-	-	-	-	-	+
	4,40	-	-	-	-	-	-	-

	2,30	-	-	-	-	-	-	-
	1,15	-	-	-	-	-	-	-
P10	162,96	++	-	+	-	-	-	++
	81,48	+++	-	+	-	-	-	++
	40,74	+++	-	++	-	-	-	++
	20,37	+++	-	+	-	-	-	++
	10,18	++	-	-	-	-	-	+
	3,09	+	-	-	-	-	-	+
	2,35	-	-	-	-	-	-	+
	1,27	-	-	-	-	-	-	+
P11	143,18	++	-	-	-	-	-	++
	72,39	++	-	-	-	-	-	+
	36,29	++	-	-	-	-	-	+
	18,15	+	-	-	-	-	-	+
	9,07	-	-	-	-	-	-	+
	4,34	-	-	-	-	-	-	+
	2,27	-	-	-	-	-	-	-
	1,13	-	-	-	-	-	-	-
P12	127,32	++	-	-	-	-	-	++
	63,76	++	-	-	-	-	-	++
	31,88	++	-	-	-	-	-	+
	13,94	+	-	-	-	-	-	+
	7,97	-	-	-	-	-	-	-
	3,98	-	-	-	-	-	-	-
	1,99	-	-	-	-	-	-	-
	1,00	-	-	-	-	-	-	-
P15	127,30	++	-	-	-	-	-	+
	63,63	++	-	-	-	-	-	+
	31,82	++	-	-	-	-	-	+
	13,91	++	-	-	-	-	-	+
	7,94	-	-	-	-	-	-	-

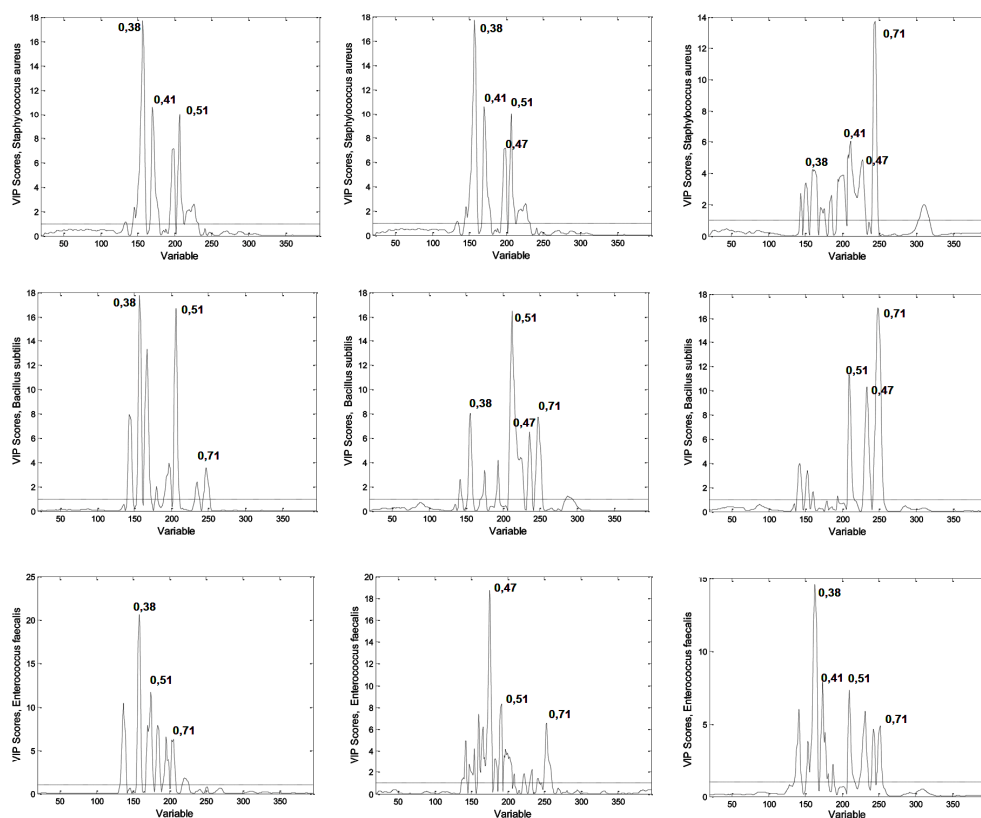
	3,98	-	-	-	-	-	-	-
	1,99	-	-	-	-	-	-	-
	0,99	-	-	-	-	-	-	-
P16	124,78	++	-	-	-	-	-	+
	62,39	++	-	-	-	-	-	+
	31,19	++	-	-	-	-	-	+
	13,40	+	-	-	-	-	-	+
	7,80	-	-	-	-	-	-	+
	3,90	-	-	-	-	-	-	+
	1,95	-	-	-	-	-	-	-
	0,97	-	-	-	-	-	-	-
P17	117,62	+++	-	-	-	-	-	+
	38,81	+++	-	-	-	-	-	+
	29,40	+++	-	-	-	-	-	+
	14,70	+++	-	-	-	-	-	+
	7,33	++	-	-	-	-	-	+
	3,67	+	-	-	-	-	-	+
	1,84	-	-	-	-	-	-	+
	0,92	-	-	-	-	-	-	+
P19	141,26	++	-	-	-	-	-	+
	70,63	++	-	-	-	-	-	+
	33,31	+	-	-	-	-	-	+
	17,64	+	-	-	-	-	-	+
	8,83	-	-	-	-	-	-	+
	4,41	-	-	-	-	-	-	+
	2,21	-	-	-	-	-	-	-
	1,10	-	-	-	-	-	-	-
P28	163,70	++	-	-	-	-	-	+++
	82,83	++	-	-	-	-	-	+++
	41,42	++	-	-	-	-	-	+++
	20,71	++	-	-	-	-	-	++

	10,34	+	-	-	-	-	-	+
	3,18	+	-	-	-	-	-	+
	2,39	-	-	-	-	-	-	-
	1,29	-	-	-	-	-	-	-
P29	116,00	++	-	-	-	-	-	+++
	38,00	++	-	-	-	-	-	+++
	29,00	++	-	-	-	-	-	+++
	14,30	++	-	-	-	-	-	+++
	7,23	+	-	-	-	-	-	++
	3,62	-	-	-	-	-	-	+
	1,81	-	-	-	-	-	-	-
	0,91	-	-	-	-	-	-	-
P30	164,78	++	-	-	-	-	-	+++
	82,39	++	-	-	-	-	-	+++
	41,19	+	-	-	-	-	-	+++
	20,40	+	-	-	-	-	-	++
	10,30	+	-	-	-	-	-	+
	3,15	-	-	-	-	-	-	-
	2,37	-	-	-	-	-	-	-
	1,29	-	-	-	-	-	-	-
P52	110,44	++	-	-	-	-	-	++
	33,22	++	-	-	-	-	-	++
	27,61	++	-	-	-	-	-	++
	111,44	+	-	-	-	-	-	++
	33,72	+	-	-	-	-	-	+
	27,86	-	-	-	-	-	-	-
	112,44	-	-	-	-	-	-	-
	36,22	-	-	-	-	-	-	-
P51	132,70	++	-	-	-	-	-	++
	66,33	++	-	-	-	-	-	++
	33,17	+	-	-	-	-	-	++

16,39	+	-	-	-	-	-	+
8,29	-	-	-	-	-	-	+
4,15	-	-	-	-	-	-	+
2,07	-	-	-	-	-	-	-
1,04	-	-	-	-	-	-	-



Slika 2. VIP varijable dobijene na osnovu PLS modela za bakterije *Aeromonas hydrophila*, *Shigella flexneri* i *Listeria monocytogenes*.



Slika 3. VIP varijable dobijene na osnovu PLS modela za bakterije *Staphylococcus aureus*, *Enterococcus faecalis* i *Bacillus subtilis*.

BIOGRAFIJA

Petar M. Ristivojević

Petar M. Ristivojević je rođen 20. marta 1985. godine u Valjevu, Republika Srbija. Osnovnu i srednju školu završio je u Valjevu. Hemijski fakultet Univerziteta u Beogradu, smer diplomirani hemičar je upisao 2004. godine. Diplomirao je septembra 2009. godine sa prosečnom ocenom 8,63 i ocenom 10 na diplomskom radu. Školske 2009/10. godine upisao je doktorske studije na Hemijskom fakultetu Univerziteta u Beogradu.

Od 2009. do 2010. godine bio je zaposlen kao istraživač-pripravnik, a od 2010. kao istraživač-saradnik u Inovacionom centru Hemijskog fakulteta u Beogradu, d.o.o.

Od 2009. godine je angažovan na projektima finansiranim od strane Ministarstva prosvete, nauke i tehnološkog razvoja Republike Srbije (projekti broj 142062, 2009-2010. i 172017, 2011-2014; inovacioni projekat 451-03-2372-IP Tip 1/107, 2012-2013). Pored toga bio je angažovan kao saradnik na FP7 projektu FCUB-ERA 256716, 2010-2013,

Tokom jula 2011. godine boravio je na Justus von Liebig University, Giessen, Institute of Nutritional Science, Nemačka, u grupi prof. Gertrud Morlock.

Kao student doktorskih studija angažovan je u eksperimentalnoj nastavi na predmetima Analitička hemija I, Analitička hemija II i Odabrane oblasti analitičke hemije.

Petar Ristivojević je koautor šest naučnih radova publikovanih u međunarodnim časopisima, kao i šesnaest naučnih saopštenja na međunarodnim i nacionalnim naučnim skupovima.

Naučni radovi:

- 1) Petar M. Ristivojević, Filip Lj. Andrić, Jelena Đ. Trifković, Irena Vovk, Ljubiša Ž. Stanislavljević, Živoslav Lj. Tešić, Dušanka M. Milojković-Opsenica, Pattern recognition methods and multivariate image analysis in HPTLC fingerprinting of propolis extracts, *Journal of Chemometrics* (2014), [28 \(4\)](#) 301-310.
(<http://onlinelibrary.wiley.com/doi/10.1002/cem.2592/abstract>)

- 2) Gertrud E. Morlock, Petar Ristivojević, Elena S. Chernetsova, Combined multivariate data analysis of high-performance thin-layer chromatography fingerprints and Direct Analysis in Real Time mass spectra for profiling of natural products like propolis, *Journal of Chromatography A*, (2014), 1328, 104-112.
(<http://www.sciencedirect.com/science/article/pii/S0021967313019341>)
- 3) Ristivojević P., Trifković, J., Gašić, U., Andrić, F., Nedić, N., Tešić, Ž, Milojković-Opsenica, D. Ultra-high performance liquid chromatography-mass spectrometry (UHPLC–LTQ OrbiTrap MS/MS) study of phenolic profile of Serbian poplar type propolis, *Phytochemical analysis*, (2014), DOI 10.1002/pca.2544, Article in press.
(<http://onlinelibrary.wiley.com/doi/10.1002/pca.2544/abstract>)
- 4) J.Đ. Trifković, F.Lj. Andrić, P. Ristivojević, D. Andrić, Ž.Lj. Tešić, D.M. Milojković-Opsenica, Structure-retention relationship study of arylpiperazines by linear multivariate modeling, *Journal of Separation Science*, (2010) 33, 2619-2628.
(<http://onlinelibrary.wiley.com/doi/10.1002/jssc.201000200/abstract>)
- 5) J. Vlajković, F. Andrić, P. Ristivojević, A. Radoičić, Ž. Tešić, D. Milojković-Opsenica, Development and validation of a TLC method for the analysis of synthetic food-stuff dyes, *Journal of Liquid Chromatography & Related Technologies*, (2013) 36, 2476-2488.
(<http://www.tandfonline.com/doi/abs/10.1080/10826076.2013.790771#.VF98u3sgvBQ>)
- 6) Dušanka Milojković-Opsenica, Petar Ristivojević, Filip Andrić, Jelena Trifković, Planar chromatographic systems in pattern recognition and fingerprint analysis, Review, *Chromatographia*, (2013) 76, 1239-1247.
(<http://link.springer.com/article/10.1007/s10337-013-2423-9>)

Saopštenja:

- 1) J. Đ. Trifković, P. M. Ristivojević, F. Lj. Andrić, D. Andrić, Ž. Lj. Tešić, D. M. Milojković-Opsenica, Relationship Between Structure and Thin-layer Chromatographic Lipophilicity Parameter of Some Arylpiperazines, EUROANALYSIS 2009-European Conference on Analytical Chemistry, "The Impact of Analytical Chemistry on Quality of Life", September 2009, Innsbruck, Austria, Book of Abstracts p. 121.

- 2) Khalil Salem A. M. Shweshein, Petar Ristivojević, Aleksandra Radoičić, Filip Andrić, Živoslav Lj. Tešić, Dušanka M. Milojković-Opsenica, Hydrophilic Interaction Planar Chromatography of Geometrical Isomers of Some Co(III) Complexes, The XXXIVth SYMPOSIUM, Chromatographic Methods of Investigating The Organic Compounds, Katowice - Szczyrk, Polland, May 24th-27th, 2010, Book of Abstracts p. 4.
- 3) Filip Lj. Andrić, Petar M. Ristivojević, Živoslav Lj. Tešić, Dušanka M. Milojković-Opsenica, Određivanje vazduh-vodaparticionih koeficijenata malih organskih molekula reverzno-faznom tankoslojnom hromatografijom, 49. Savetovanje Srpskog hemijskog društva, Kragujevac, Srbija, 13-14. maj 2011, Book of Abstracts AH-01, p.13.
- 4) F. Andrić, P. Ristivojević, J. Trifković, Ž. Tešić, D. M. Milojković-Opsenica, Determination of the soil-water, octanol-water, and air-water partition coefficients for the twelve benzodiazepines by the means of the reversed-phase thin-layer chromatography, The XXXIVst Symposium, Chromatographic Methods of Investigating The Organic Compounds, Katowice - Szczyrk, Polland, June 8-10, 2011, Book of Abstracts p. 17.
- 5) Andrić F., Ristivojević, P., Milojković Opsenica D., Tešić Ž., TLC determination of Abrahams Solvatochromic parameters for small organic molecules, International Symposium for High-performance Thin-Layer Chromatography, Basel, Switzerland, July 6-8, 2011, Book of Abstracts p. 85.
- 6) Andrić F., Ristivojević P., Šolaja B., Milojkovic Opsenica D., Terzić N., Opsenica D., determination of lipophilicity of some newly synthesized potential antimalarials by the means of reversed-phase thin-layer chromatography. International Symposium for High-performance Thin-Layer Chromatography, Basel, Switzerland, July 6-8, 2011, Book of Abstracts p. 86.
- 7) P. Ristivojević, J. Trifković, N. Terzić, B. Šolaja, D. Milojković-Opsenica, A Quantitative Structure-Retention Relationship Study of Adamantane Derivatives of 4- amino-7-chloroquinoline, EUROANALYSIS 2011 - European Conference on Analytical Chemistry, "Challenges in Modern Analytical Chemistry", September 2011, Belgrade, Serbia, Book of Abstracts CH. 30.
- 8) E.S. Chernetsova, P.Ristivojević, G.E. Morlock "Characterization of propolis using planar chromatography, Direct Analysis in Real Time mass spectrometry and multivariate data

analysis” 8th Winter Symposium on Chemometrics, Drakino, Russia, 27.02.-02.03.2012:
Book of Abstracts p.16.

- 9) G.E. Morlock, P. Ristivojević, E.S. Chernetsova “Combined use of planar chromatography and Direct Analysis in Real Time mass spectrometry for characterization of propolis samples by multivariate data analysis”; Joint Conference of German Mass Spectrometry Society and Polish Mass Spectrometry Society, Poznań, Poland, 04.-07.03.2012, Book of Abstracts p. 329.
- 10) P. Ristivojević, U. Gašić, T. Tosti, A. Radoičić, Lj. Stanisavljević, D. Milojković- Opsenica, Evaluation of total polyphenolics, flavonoids and scavenging capacity of the DPPH radical in Serbian propolis, 50. Savetovanje Srpskog hemijskog društva, Beograd, Srbija, 14 i 15. jun 2012, AH P4, Book of Abstracts p.17.
- 11) P. Ristivojević, J.Trifković, F. Andrić, N.Nedić, D.Milojković-Opsenica, Determination of phenolic compounds in propolis from Serbia by UPLC-LTQOrbitrap MS-MS, Belgrade Food International Conference, Food, health and well being, Belgrade, Serbia, 26-28 November, 2012, Book of Abstracts p. 1.21.
- 12) Dimkić I., Ristivojević P., Berić, T., Dragojević M., Jovanović T., Stanković S., Antibacterial potential of serbian propolis from different regions against most common pathogens, Belgrade Food International Conference, Food, health and well being, Belgrade, Serbia, 26-28 November, 2012, Book of Abstracts p. 2.14.
- 13) Stanković, S., Dimkić, I., Ristivojević, P., Berić, T., Draganić, V.D., Fira, Đ., 2013. Bacteriostatic and bactericidal effect of Serbian propolis against pathogenic bacteria. 5th FEMS Congress of European Microbiologists, Leipzig, Germany, July 21-25, 2013, Book of Abstracts p. 353.
- 14) P. Ristivojević, F. Lj. Andrić, J. Đ. Trifković, I. Dimikić, S. Stanković, Ž.Lj. Tešić, D. M. Milojković-Opsenica, Planar chromatography and multivariate image analysis in classification and modeling of antioxidative and antimicrobial activity of propolis extracts. Conferentia Chemometrica, Sopron, Hungary, September 8-11, 2013, Book of Abstracts, p. 01.
- 15) Petar Ristivojević, Jelena Trifković, Irena Vovk, Filip Andrić, Dušanka Milojković-Opsenica, Fingerprinting of serbian, slovenian and croatian propolis using

HPTLC and pattern recognition methods, International Symposium for High-Performance Thin-Layer Chromatography, France, Lyon, 2 -4 July 2014. Book of Abstracts p. 9.

- 16) Ivica Dimkić, Petar Ristivojević, Tanja Berić, Slaviša Stanković, Dušanka Milojković-Opsenica, Application of indirect bioautography for the study of Serbian propolis. International Symposium on Bee Product 3rd edition - Annual meeting of the International Honey Commission (IHC), Croatia, Opatija, September 28-October 1, 2014, Book of Abstracts, p. 113.

Прилог 1.

Изјава о ауторству

Потписани Петар М. Ристивојевић

број индекса дх15/2009

Изјављујем

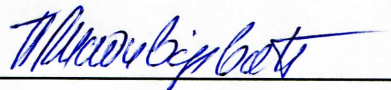
да је докторска дисертација под насловом

Одређивање хемијског састава, антиоксидативних и антимикробних
својстава прополиса топола типа из различитих региона Србије

- резултат сопственог истраживачког рада,
- да предложена дисертација у целини ни у деловима није била предложена за добијање било које дипломе према студијским програмима других високошколских установа,
- да су резултати коректно наведени и
- да нисам кршио/ла ауторска права и користио интелектуалну својину других лица.

Потпис докторанда

У Београду, 11. 12. 2014.



Прилог 2.

**Изјава о истоветности штампане и електронске
верзије докторског рада**

Име и презиме аутора __ Петар М.Ристивојевић _____

Број индекса _____дх15/2009_____

Студијски програм _____ доктор хемијских наука_____

Наслов рада _ Одређивање хемијског састава, антиоксидативних и
антимикробних својстава прополиса топола типа из различитих региона
Србије _____

Ментор____др Душанка Милојковић Опсеница_____

Потписани Петар М. Ристивојевић_____

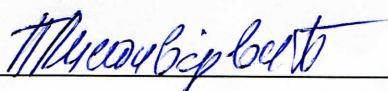
Изјављујем да је штампана верзија мог докторског рада истоветна електронској верзији коју сам предао/ла за објављивање на порталу **Дигиталног репозиторијума Универзитета у Београду**.

Дозвољавам да се објаве моји лични подаци везани за добијање академског звања доктора наука, као што су име и презиме, година и место рођења и датум одбране рада.

Ови лични подаци могу се објавити на мрежним страницама дигиталне библиотеке, у електронском каталогу и у публикацијама Универзитета у Београду.

Потпис докторанда

У Београду, 11.12.2014.



Прилог 3.

Изјава о коришћењу

Овлашћујем Универзитетску библиотеку „Светозар Марковић“ да у Дигитални репозиторијум Универзитета у Београду унесе моју докторску дисертацију под насловом:

Одређивање хемијског састава, антиоксидативних и антимикробних
својстава прополиса топола типа из различитих региона Србије
која је моје ауторско дело.

Дисертацију са свим прилозима предао/ла сам у електронском формату погодном за трајно архивирање.

Моју докторску дисертацију похрањену у Дигитални репозиторијум Универзитета у Београду могу да користе сви који поштују одредбе садржане у одабраном типу лиценце Креативне заједнице (Creative Commons) за коју сам се одлучио/ла.

1. Ауторство
2. Ауторство - некомерцијално
3. Ауторство – некомерцијално – без прераде
4. Ауторство – некомерцијално – делити под истим условима
5. Ауторство – без прераде
6. Ауторство – делити под истим условима

(Молимо да заокружите само једну од шест понуђених лиценци, кратак опис лиценци дат је на полеђини листа).

Потпис докторанда

У Београду, 11.12.2014.

Miroslav Grcic

1. Ауторство - Дозвољаваате умножавање, дистрибуцију и јавно саопштавање дела, и прераде, ако се наведе име аутора на начин одређен од стране аутора или даваоца лиценце, чак и у комерцијалне сврхе. Ово је најслободнија од свих лиценци.

2. Ауторство – некомерцијално. Дозвољаваате умножавање, дистрибуцију и јавно саопштавање дела, и прераде, ако се наведе име аутора на начин одређен од стране аутора или даваоца лиценце. Ова лиценца не дозвољава комерцијалну употребу дела.

3. Ауторство - некомерцијално – без прераде. Дозвољаваате умножавање, дистрибуцију и јавно саопштавање дела, без промена, преобликовања или употребе дела у свом делу, ако се наведе име аутора на начин одређен од стране аутора или даваоца лиценце. Ова лиценца не дозвољава комерцијалну употребу дела. У односу на све остале лиценце, овом лиценцом се ограничава највећи обим права коришћења дела.

4. Ауторство - некомерцијално – делити под истим условима. Дозвољаваате умножавање, дистрибуцију и јавно саопштавање дела, и прераде, ако се наведе име аутора на начин одређен од стране аутора или даваоца лиценце и ако се прерада дистрибуира под истом или сличном лиценцом. Ова лиценца не дозвољава комерцијалну употребу дела и прерада.

5. Ауторство – без прераде. Дозвољаваате умножавање, дистрибуцију и јавно саопштавање дела, без промена, преобликовања или употребе дела у свом делу, ако се наведе име аутора на начин одређен од стране аутора или даваоца лиценце. Ова лиценца дозвољава комерцијалну употребу дела.

6. Ауторство - делити под истим условима. Дозвољаваате умножавање, дистрибуцију и јавно саопштавање дела, и прераде, ако се наведе име аутора на начин одређен од стране аутора или даваоца лиценце и ако се прерада дистрибуира под истом или сличном лиценцом. Ова лиценца дозвољава комерцијалну употребу дела и прерада. Слична је софтверским лиценцама, односно лиценцама отвореног кода.